Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Bauereisen

PROTHROMBIN:
REINDARSTELLUNG, EINHEITLICHKEIT, MOLEKULARER AUFBAU, GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHES VERHALTEN

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rolf-Christian Platzek
aus Forchheim

Würzburg 1970

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Bauereisen

PROTHROMBIN:
REINDARSTELLUNG, EINHEITLICHKEIT, MOLEKULARER AUFBAU, GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHES VERHALTEN

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rolf-Christian Platzek
aus Forchheim

Würzburg 1970

Referent: Prof. Dr. med. H. Schröer

Korreferent: Prof. Dr. med. E. Bauereisen

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Methodik	
	A. Aufbereitung des Blutes	8
	B. Prothrombin: Isolierung, quantitative und qualitative Bestimmung	8
	C. Thrombin und Autoprothrombin C: Herstellung und Aktivitätsbestimmung	16
	D. Prethrombin und Autoprothrombin III: Herstellung und Aktivitätsbestimmung	19
	E. Proteintrennungsverfahren: Säulenchromatographie, Celluloseacetatelektrophorese, Elektrofokussierungsverfahren	22
	F. Technik der Tierversuche	26
	G. Geräte, Lösungen, Reagentien	26
III.	Versuchsergebnisse	
	A. Prothrombinisolierung	29
	B. Ergebnisse der Untersuchungen zur Frage der Einheitlichkeit der gewonnenen Prothrombinpräparate	37
	C. Beobachtungen bei der Auftrennung von Prothrombin an DEAE-Cellulose	41
	D. Prüfung der biologischen Wirkung der aus Prothrombin gewonnenen Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III	43
IV.	Besprechung der Versuchsergebnisse	51
V.	Zusammenfassung	64
VI.	Literaturverzeichnis	66
	Lebenslauf	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0110

1. Einleitung

Die Fibrinpolymerisation als eigentlicher Grundvorgang der Gerinnung des Blutes wird bekanntlich durch ein proteolytisches Enzym des Plasmas, das Thrombin, eingeleitet. Während diese sichtbare Phase der Blutgerinnung heute als weitgehend aufgeklärt gilt, bestehen noch zahlreiche Unklarheiten über den Mechanismus der Freisetzung des aktiven Thrombins aus seiner inaktiven Vorstufe. Meinungsübereinstimmung herrscht nur in der Feststellung, daß die Thrombinfreisetzung mit einer Reihe von Reaktionen zwischen verschiedenen Faktoren des Blutes einhergeht, deren Fehlen sich in Gerinnungsdefekten manifestiert. Bezüglich der Erklärung von Mechanismus und zeitlichem Ablauf der Einzelreaktionen stehen sich indessen zwei verschiedene Auffassungen gegenüber:

1. Die Mehrzahl der Gerinnungsforscher hält die diskutierten Gerinnungsfaktoren für chemisch individuelle Verbindungen (Proteine, Lipoide), die im Organismus unabhängig voneinander synthetisiert werden und im Plasma in inaktiver Form vorliegen. Ihre Aktivierung kann auf zwei Wegen (intrinsic bzw. extrinsic activation) nach einer Kette von intermediären Reaktionen erfolgen, deren Endprodukt (Thromboplastin) die Umwandlung des Thrombin-Zymogens in Thrombin enzymatisch katalysiert. Jeder Gerinnungsdefekt wird dementsprechend als tatsächliches oder - im Falle einer Beteiligung von Hemmstoffen - als funktionelles Fehlen einer bestimmten Molekülart im Plasma angesehen. In dem von MacFARLANE (25) inaugurierten "Kaskadenschema" sowie auch in der "waterfall sequence" von DAVIE und RATNOFF (9) hat diese "Faktorensequenztheorie" ihre wohl konsequenteste Formulierung gefunden (Abb. 1).

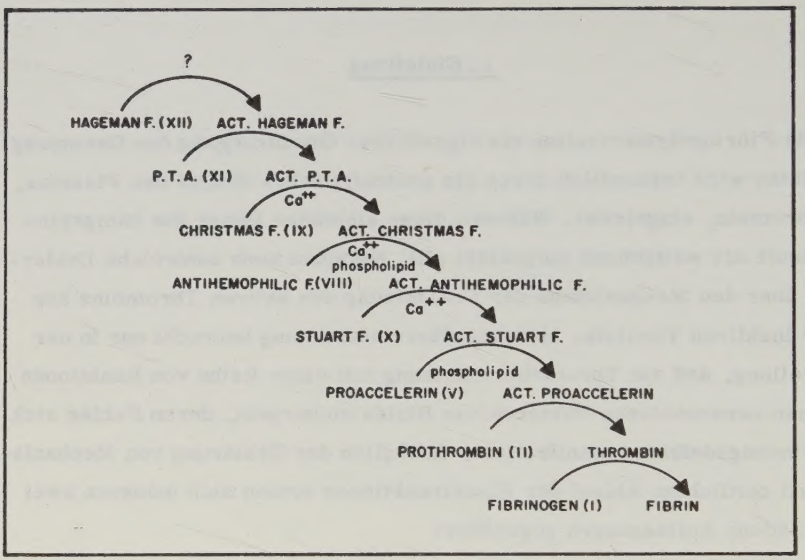

Abb.1: "Wasserfallsequenz" der Blutgerinnung (9). Sie zeigt die stufenweise Aktivierung der gerinnungsaktiven Blutbestandteile bis einschließlich der Fibrinpolymerisation. Hierbei überführt jeweils der aktivierte übergeordnete Faktor den nächstfolgenden in den aktiven Zustand. Ist zu diesem Vorgang zusätzlich die Anwesenheit von Ca-Ionen oder Phospholipiden erforderlich, so ist dies bei den betreffenden Pfeilen angegeben. Durch das Fragezeichen am ersten Pfeil ist angedeutet, daß das auslösende Prinzip noch nicht sicher geklärt ist. Abkürzungen: P.T.A. = plasma thromboplastin antecedent; act.F = aktivierter Faktor

2. Im Gegensatz zu der vorwiegend von klinischer Seite vertretenen Faktorentheorie stellen SEEGERS (44, 46) und seine Mitarbeiter das Zymogen des Thrombins in den Mittelpunkt von prothrombinabhängigen Reaktionen, die zur "Auto"-Aktivierung des Zymogens führen. Nach dieser experimentell sorgfältig begründeten Theorie ist das Prothrombin ein einheitliches Proteinmolekül, das je nach den Bedingungen, denen es ausgesetzt ist, eine Reihe verschiedener gerinnungsaktiver Bruchstücke hervorzubringen vermag.

Diese "Autoprothrombine" sind zum Teil offensichtlich identisch mit gewissen Gerinnungsfaktoren im Sinne der Faktorensequenztheorie. Inaktive

Vorstufen dieser Faktoren als chemisch eigenständige Verbindungen gibt es nach der "autokatalytischen Derivatetheorie" von SEEGERS nicht; gemeinsame Vorstufe ist vielmehr das Prothrombin selbst. Von den Produkten des Prothrombinabbaus katalysieren lediglich die Fermente Thrombin und Autoprothrombin C (= Faktor X) die Aktivierung des Prothrombins. Die anderen Derivate wirken in Verbindung mit jeweils einem dieser beiden Enzyme fördernd oder hemmend auf die Prothrombinaktivierung und beeinflussen Richtung und Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes (Abb. 2).

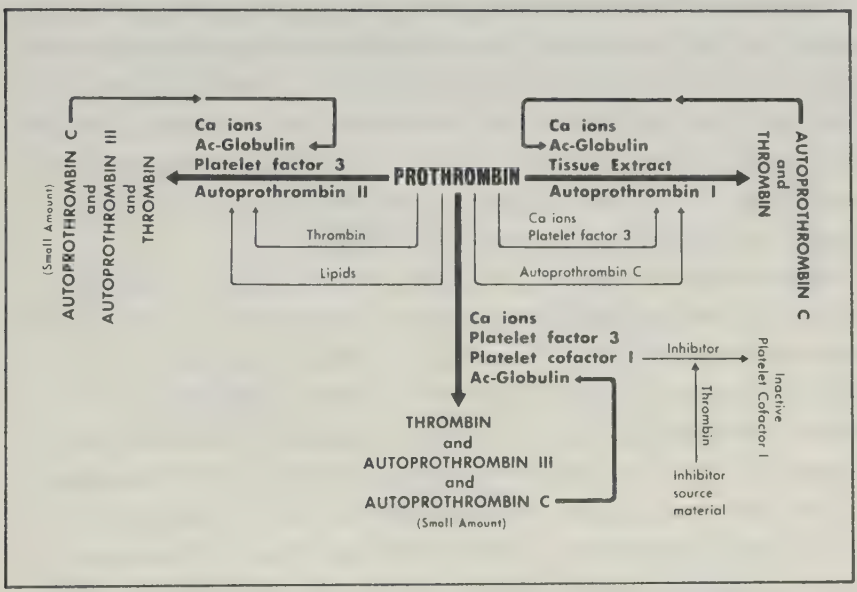

Abb.2: Mechanismus der Prothrombinaktivierung nach Seegers (46). Im Mittelpunkt des Schemas steht das Prothrombin, das unter bestimmten Reaktionsverhältnissen eine Umwandlung in Thrombin und Autoprothrombin C, in geringem Umfang auch in Autoprothrombin III erfährt. Lediglich die Fermente Thrombin und Autoprothrombin C katalysieren die Aktivierung des Prothrombins.

Die Entscheidung der Frage, welcher von beiden - in wesentlichen Punkten gegensätzlichen - Theorien die größere Gültigkeit zukommt, ist für die

weitere fruchtbare Erforschung der Blutgerinnung von ausschlaggebender Bedeutung. Vom physiologischen und biochemischen Standpunkt ist der autokatalytischen Derivatetheorie der Vorzug vor der Faktorensequenztheorie zu geben, weil sie im Unterschied zu letzterer auf Versuchsergebnissen beruht, die unter überschaubaren experimentellen Bedingungen gewonnen wurden. Ausgangsmaterial dieser Versuche ist ein aus Plasma isoliertes Prothrombin mit relativ hohem Reinheitsgrad, dessen physikalisch-chemische Kriterien allgemein, d.h. auch von den meisten Anhängern der Kaskadentheorie, zur Charakterisierung des Prothrombin verwendet werden.

Bei dem von SEEGERS und Mitarbeitern (43, 51) entwickelten Isolierungsgang wird das Prothrombin durch isoelektrische Präzipitation aus verdünntem Rinderplasma gefällt, nach anschließendem Lösen an Magnesiumhydroxid adsorbiert und in einer CO_2-Atmosphäre wieder eluiert. Es folgen Dialyse und erneute isoelektrische Fällung. Durch anschließende Säulenchromatographie an IRC-50 (35, 50) sowie durch Gelfiltration an Sephadex (31) kann eine zusätzliche Reinigung erzielt werden.

Das so gewonnene Präparat, ein Glycoproteid der Alpha -2- Globulinfraktion (Molekulargewicht 68 000), weist eine spezifische Aktivität von etwa 33 000 Iowa-Einheiten pro mg Tyrosin bzw. 2 000 Iowa-Einheiten oder 1 200 NIH-Einheiten pro mg Trockengewicht auf und stellt sich in der trägerfreien Elektrophorese bei neutralem und alkalischem Milieu als Einzelkomponente dar. Elektronenoptisch wurde eine homogene Partikelkonfiguration und eine Teilchengröße von durchschnittlich 156,3 Å festgestellt (38). Als C-terminale Aminosäuren wurden Tyrosin und Glycin, als aminoendständige Aminosäure Alanin (1 Mol pro Mol Prothrombin) ermittelt (28, 29, 59).

Die Deutbarkeit der Befunde, die unter Verwendung dieses Prothrombinpräparates erhalten wurden und auf die sich die autokatalytische Derivatetheorie stützt, wird von verschiedenen Autoren mit dem Hinweis auf mögliche Verunreinigungen des Präparates mit eigenständigen Gerinnungsfaktoren bestritten. Nicht das Prothrombin, sondern die "Verunreinigungen" werden von dieser Forschergruppe für das oben erwähnte Auftreten unterschiedlicher

Aktivitäten in Prothrombin-Aktivierungssystemen verantwortlich gemacht. Diese Argumentation hat jedoch wenig Überzeugungskraft; denn die Prothrombinderivate entstehen in solchen Systemen zeitlich parallel mit dem Verschwinden des Prothrombins, und in einer zusatzfreien Prothrombinlösung treten unter geeigneten Bedingungen (hohe Salzkonzentration) Thrombin und Autoprothrombin C (Abb. 3) ebenfalls in dem Maße zunehmend auf, wie die Prothrombinaktivität abnimmt (54). Verunreinigungen können über ihre initial gegebene Konzentration hinaus nicht anwachsen; selbst wenn man ihre Anwesenheit in Form inaktiver Vorstufen annimmt, erscheint es unwahrscheinlich, daß ihre Aktivierung mit der dem Verschwinden des Prothrombins entsprechenden Geschwindigkeit verlaufen sollte.

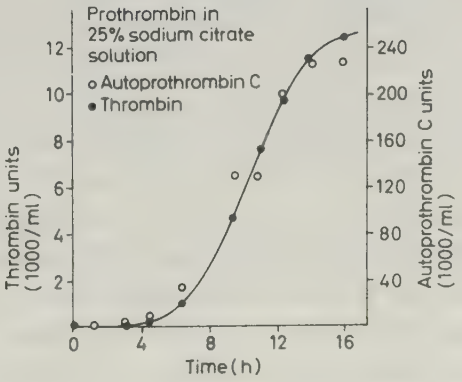

Abb. 3: Aktivierung von reinem Prothrombin in einer 25 %igen Natriumzitratlösung zu Thrombin und Autoprothrombin C. Zu beachten ist das Kurvenbild, das auf den Ablauf eines autokatalytischen Prozesses hinweist (54).

Andererseits ergeben sich aus hier nicht näher zu erörternden Resultaten der SEEGERschen Arbeitsgruppe (44, 46, 47, 53, 55) sowie aus früheren Befunden von SCHRÖER (39) Anhaltspunkte dafür, daß das Prothrombin kein chemisch einheitliches Molekül, sondern ein Komplex ist, dessen verschie-

dene Polypeptidketten funktionell miteinander verknüpft sind. Die derzeit im Gang befindlichen Untersuchungen dieser Frage, die im Hinblick auf eine mögliche Integrierung der beiden eingangs erwähnten, scheinbar alternativen Gerinnungstheorien von zentraler Bedeutung sind, setzte naturgemäß die Verwendung von Prothrombinpräparationen höchstmöglichen Reinheitsgrades voraus, da Beimengungen eliminierbarer Proteine in den verwendeten Präparaten zwangsläufig zu fragwürdigen Aussagen über den vermuteten Komplexcharakter führen würden.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Aufgabe bestand demgemäß in der Erstellung einer zuverlässigen Methode zur Isolierung von hochgereinigtem Prothrombin aus Rinderplasma, dem Aufbau der erforderlichen quantitativen Nachweisverfahren, sowie der kritischen Überprüfung der einzelnen, im Gang des Isolierungsverfahrens vorzunehmenden Reinigungsschritte mit dem Ziel, durch weitere Verbesserung der bisher gebräuchlichen Methodik zu Reinheitsgraden der erhaltenen Präparationen zu gelangen, welche die in der Literatur angegebenen nach Möglichkeit übertreffen sollten. Das so gewonnene Prothrombin war hinsichtlich Einheitlichkeit des Materials zu werten, seine Spaltbarkeit in gerinnungsaktive Untereinheiten zu untersuchen und seine mögliche chemische Struktur zu bedenken. Der Versuch einer Einordnung der Ergebnisse dieser Untersuchungen und Überlegungen in die heute diskutierten Gerinnungsschemata mußte dem logischerweise folgen, und abschließend waren die hergestellten Prothrombinuntereinheiten im Tierexperiment auf die von ihnen zu fordernde biologische Wirksamkeit zu prüfen.

II. Methodik

A. Aufbereitung des Blutes

Zur Gewinnung von Rinderplasma wurde Blut unmittelbar nach der Tötung der Rinder aus der Halsschlagader entnommen, in 2-Liter-Weithalsflaschen aufgefangen und gründlich mit einem Antikoagulans vermischt, das zuvor in die Flaschen eingefüllt worden war. Da verschiedene Antikoagulantien verwendet wurden, ist deren Zusammensetzung im folgenden jeweils bei der Beschreibung der betreffenden Versuchsansätze angegeben.

Von dem ungerinnbar gemachten Blut wurde das Plasma anschließend durch 30-minütiges Zentrifugieren (3000 U/min, g-Zahlen siehe Seite 26) bei 0^{o}C abgetrennt, eingefroren und bei -20^{o}C aufbewahrt. Auch nach mehrwöchiger Lagerung zeigt derart aufbereitetes Rinderplasma einen nur geringen Prothrombinaktivitätsverlust.

B. Prothrombin: Isolierung, quantitative und qualitative Bestimmung

Prothrombinisolierung

Die Herstellung von Prothrombinreinpräparaten erfolgte grundsätzlich nach einem zuerst von SEEGERS und Mitarbeitern (42, 43, 51) beschriebenen Verfahren. Die Isolierung wurde unter Anwendung verschiedener Modifikationen nach zwei Methoden durchgeführt, die sich lediglich in den späteren Reinigungsschritten voneinander unterscheiden (Abb. 4).

Ausgangsmaterial bildete Plasma, gewonnen aus Vollblut, das durch Mischung von 180 ml Antikoagulans (Zusammensetzung: 2, 05 % Kaliumoxalat, 0, 68 % Oxalsäure in physiologischer Kochsalzlösung) mit 1820 ml Blut ungerinnbar gemacht worden war.

Isolierungsgang:

Isoelektrische Fällung bei pH 5, 1

3 Liter Plasma wurden unter ständigem Rühren in einem PVC-Tank mit 50 l Aqua dest. gemischt. Um den Tank waren etwa fünfzehn Windungen eines

Plastikschlauches (1/2") geführt, der zur Vorkühlung des Wassers sowie während der Sedimentation ständig aus einem Kryostaten (Colora KT 40 S) durchströmt wurde, wodurch die Temperatur im Bottich konstant bei 0°C gehalten wurde.

Durch Zugabe von verdünnter Essigsäure wurde ein Teil der Eiweißbestandteile bei pH 5,1 ausgefällt. Das Präzipitat setzte sich innerhalb von maximal 8 Stunden vollständig ab. Hiernach wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, der Bodensatz (ca. 3 Liter) 15 Minuten bei 3000 U/min (0°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen.

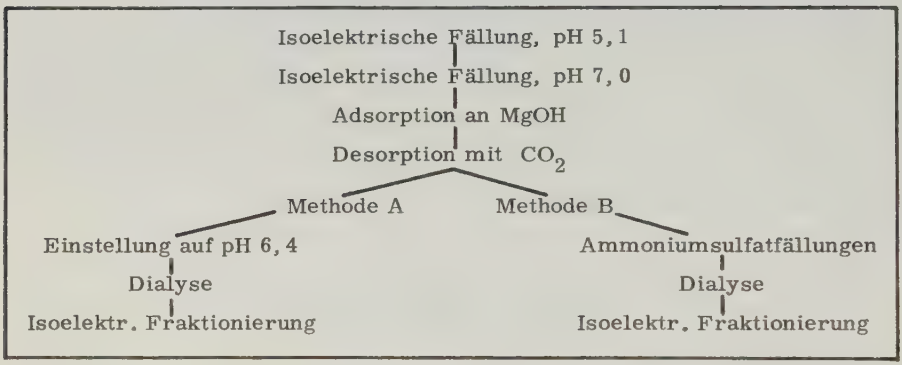

Abb.4: Übersicht über das Vorgehen bei den zur Prothrombinreindarstellung angewendeten Verfahren.

Fällung bei pH 7,0

Das Sediment wurde in 500 ml Kaliumoxalatwasser (0,075 g $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ auf 1 l 0,9 %iger NaCl-Lösung) mit dem Homogenisator 7 Minuten lang bei 40°C gelöst, anschließend mit 0,5 n Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt, erneut 3 Minuten homogenisiert und abschließend das pH noch einmal überprüft. Die Suspension wurde nun 30 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand weiterverarbeitet, das Sediment und aufschwimmendes Material verworfen.

Adsorption an Magnesiumhydroxid

Der Überstand wurde unter Rühren 15 Minuten bei Zimmteremperatur an eine Aufschwemmung von $Mg(OH)_2$ - durch Dispergieren von

62,5 g $Mg(OH)_2$-Paste in 125 ml Aqua dest. hergestellt - adsorbiert. Bei dem folgenden Zentrifugieren (12 Minuten, 6000 U/min) setzte sich das $Mg(OH)_2$ mit dem adsorbierten Protein am Boden ab. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment anschließend zweimal in je etwa 150 ml auf 0^oC vorgekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und jeweils 10 Minuten bei 6000 U/min in der Kälte zentrifugiert. Der Überstand einschließlich aufschwimmendem Material wurde wiederum jeweils verworfen, und das zuletzt erhaltene Sediment mit dem Homogenisator in ca. 180 ml physiologischer Kochsalzlösung dispergiert, wodurch sich eine milchig-trübe Aufschwemmung bildete.

Desorption mit CO_2

Diese Aufschwemmung wurde in einen Druckautoklaven eigener Herstellung (Abb.5) eingefüllt. Dieser wurde fest verschraubt und zunächst bei geöffnetem Auslaßventil sorgfältig mit CO_2 durchgeblasen. Sodann wurde auch das Auslaßventil verschlossen, der CO_2-Druck auf 4,5 atm erhöht und der Druckbehälter 30 Minuten maschinell geschüttelt. Mehrmaliges Durchblasen mit CO_2 während des Schüttelns erwies sich zur Erzielung des erwünschten Desorptionsgrades als unerläßlich. Am Ende der Desorptionszeit wurde der Druck aus dem Autoklaven langsam abgelassen. Die jetzt inhomogene, schmutzig-graue Lösung enthielt eine Aufschwemmung von Magnesiumkarbonat. Aufrühren dieser Lösung verursachte starke Schaumbildung durch entweichendes CO_2. Durch Zugabe von einem Tropfen Tri-n-butyl-phosphat wurde dieser Schaum beseitigt. Anschließend erfolgte Zentrifugation (25 Minuten, 6000 U/min, 0^oC). Das Sediment wurde verworfen, der Überstand weiterverwendet.

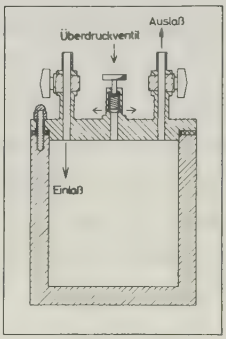

Abb.5: Druckautoklav, Schnittbildzeichnung

Im weiteren Vorgehen wurden verschiedene Wege beschritten (vergleiche Abb.4); bei "Methode A" schloß sich eine Säurefällung in ionenarmem Milieu an, bei "Methode B" folgten Ammoniumsulfatfällungen.

Methode A

Säurefällung bei pH 6,4 - 6,5

Die überstehende, leicht opaleszierende Lösung wurde in ein von einem Eismantel umgebenes Gefäß gegossen und unter ständigem Rühren mit 1 n Salzsäure bis zu einem pH von 6,4 - 6,5 versetzt. Die Lösung pufferte dabei stark nach, so daß für diese Einstellung etwa 2 - 4 Stunden benötigt wurden; der Säureverbrauch lag dabei zwischen 80 und 120 ml je 3 l Ausgangsplasma.

Dialyse

Nach der pH-Einstellung wurde die Lösung in einen Dialysierschlauch gefüllt und letzterer in eine automatisch gekühlte Dialysierkammer (Fassungsvermögen etwa 10 Liter Aqua dest.) gehängt. Nach zweimaligem Wasserwechsel in Abständen von ungefähr 30 Minuten wurde der Dialysierschlauch in einen mit 50 l frischem Aqua dest. gefüllten Bottich gebracht und weitere 6 - 8 Stunden bei 0^{o}C dialysiert. Abschließend erfolgte in einer Dialysierkammer eine zweistündige Dialyse gegen Aqua dest., das mit 10 % Polyaethylenglycoll ("Polywax", Molekulargewicht 40 000) versetzt war. Nach dem Herausnehmen des Schlauches wurde letzterer gründlich von anhaftendem Polywax gereinigt, und der spezifische Widerstand des Dialysates mittels Konduktometer bestimmt. Lag dieser unter 1500 Ohm · cm, so wurde die Dialyse bis zum Überschreiten dieses Wertes fortgesetzt.

Der Schlauchinhalt wurde nun durch etwa 5 Schichten sauber gewaschenen Mulls filtriert, der Rückstand gründlich ausgedrückt, die abfiltrierte Lösung 10 Minuten bei 6000 U/min (0^{o}C) zentrifugiert und der Bodensatz verworfen.

Isoelektrische Fraktionierung

Der Überstand wurde durch Zugabe von 0,5 n Salzsäure auf pH 6,4 eingestellt, erneut 10 Minuten (6000 U/min, 0°C) zentrifugiert und der Überstand nunmehr auf pH 4,5 gebracht. Durch erneutes Zentrifugieren (10 Minuten, 6000 U/min, 0°C) wurde das isolierte Prothrombin als Sediment abgetrennt. Meist bildete sich dabei am Zentrifugenbecher ein aus inaktivem Material bestehender Schmierrand, der entfernt wurde. Das Sediment wurde nun in etwa 5 - 10 ml Aqua dest. unter vorsichtiger Zugabe weniger Tropfen 0,1 n Natronlauge gelöst und auf pH 7,0 - 7,2 eingestellt. Das so gewonnene Endprodukt wurde nach Ermittlung der Prothrombinaktivität und des Tyrosingehaltes eingefroren und in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt.

Methode B

Fällungen mit Ammoniumsulfat

Der nach Desorption und anschließendem Zentrifugieren gewonnenen Lösung wurde bei 0°C (Temperaturkonstanz!) unter ständigem Rühren tropfenweise ein gleiches Volumen bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugefügt. Der sich dabei bildende Niederschlag, der in der Hauptsache Fibrinogen enthielt, wurde durch Zentrifugieren (25 Minuten, 6000 U/min, 0°C) entfernt. Dem Überstand wurde erneut ein der Ausgangslösung entsprechendes Volumen Ammoniumsulfatlösung in der oben angeführten Weise zugegeben. Anschließend wurde 5 Minuten weitergerührt, um ein gründliches Lösen des Salzes zu erreichen, dann 20 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in wenigen ml Aqua dest. vollständig gelöst.

Dialyse

Diese Lösung wurde nun in einen - nicht zu klein zu wählenden - Dialysierschlauch gefüllt und zunächst zweimal je ca. 20 Minuten gegen 10 l Aqua dest. dialysiert. Dann wurde der Schlauch in eine Gittervorrichtung eingespannt, die eine möglichst gleichmäßige Flüssigkeitsverteilung im Schlauch erlaubte, die Vorrichtung in einen mit 50 l Aqua dest. gefüllten PVC-Bottich gebracht und mit einem Elektromotor so verbunden, daß sie sich im Wasser

um die eigene Achse drehte und so zugleich für die nötige Wasserbewegung sorgte. Die Dialyse im Bottich dauerte insgesamt 4 Stunden. Hiernach war im allgemeinen ein spezifischer Widerstand von mindestens 6000 Ohm . cm erreicht; bei niedrigeren Werten wurde bis zum Überschreiten dieses Wertes weiter dialysiert.

Isoelektrische Fraktionierung

Nach der Dialyse zeigte sich im Schlauch eine Trübung, die durch Zentrifugieren (15 Minuten, 6000 U/min, 0°C) entfernt wurde. Die überstehende Lösung wurde mit 0,1 n Salzsäure auf pH 5,4 eingestellt, die sich bildende Trübung erneut durch Zentrifugieren (15 Minuten, 6000 U/min, 0°C) abgeschieden. Das Material, das dann im Bereich von pH 5,4 - 3,9 ausfällt und durch Zentrifugation von jeweils 15 Minuten (6000 U/min) bei 0°C erhalten werden konnte, enthielt das aktive Prothrombin.

Wie beim Verfahren A wurde auch hier das Sediment mit 0,1 n Natronlauge in Aqua dest. gelöst und auf pH 7,0 - 7,2 eingestellt. Nach der Bestimmung der Gesamtaktivität und der spezifischen Aktivität wurde die Prothrombinlösung eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Quantitative Bestimmung der Prothrombinaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Prothrombinpräparate erfolgt grundsätzlich nach dem Zweistufenverfahren von WARE und SEEGERS (63). Um aussagekräftige, verläßliche Werte mit diesem Verfahren zu erhalten, ist größtmögliche Reinheit und Konstanz der verwendeten Reagentien erforderlich. Da diese Voraussetzung durch bloße Anwendung der in der Literatur angegebenen Herstellungsverfahren häufig nicht erfüllt war, ergab sich die Notwendigkeit der Einführung methodischer Modifikationen. Im folgenden wird daher auf die Bereitung des Reaktionsgemisches, der Fibrinogenlösung und der Thrombokinase näher eingegangen.

Herstellung des Reaktionsgemisches (63)

300 g pulverisiertes gummi arabicum (Acacia) wurde in 1700 ml Aqua dest. aufgeschwemmt, das Gemisch zunächst schonend 9 Stunden bei 45°C,

dann 10 - 15 Stunden bei Zimmertemperatur und abschließend erneut 9 Stunden bei 45°C gerührt. Gröbere Bestandteile wurden durch Zentrifugieren (3 Minuten bei 6000 U/min) entfernt und die Suspension abschließend durch ein weiches Faltenfilter gegeben.

Herstellung von gereinigtem Fibrinogen (16)

Als Ausgangsmaterial diente Rinderplasma, das aus Rinderoxalatblut (200 ml 1,85 %ige Natriumoxalatlösung auf 2 l Blut) gewonnen wurde.

Zu einem Liter dieses Plasmas wurden 40 g Bariumsulfat gegeben und die Suspension eine Stunde gerührt. Das Bariumsulfat wurde durch Zentrifugation (20°C, 6000 U/min, 10 Minuten) entfernt. Um sicher alles Prothrombin zu entfernen, wurde der Überstand erneut mit 40 g Bariumsulfat versetzt, die Mischung über Nacht im Kühlschrank gerührt, am nächsten Morgen zentrifugiert (20°C, 6000 U/min, 15 Minuten) und das Sediment verworfen.

Zum Überstand wurde durch ein Sieb unter gleichmäßigem Rühren langsam 165 g Glycin gegeben und diese Lösung 30 Minuten lang gerührt. Schaumbildung wurde dabei sorgfältig vermieden. Es folgte 20-minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min, der Überstand wurde abgegossen, das Sediment in einer dem verworfenen Überstand entsprechenden Menge 0,055 m Natriumzitratlösung, pH 7,4 (imidazolgepuffert) sorgfältig gelöst (Lösungszeit ca. 45 Minuten).

Es folgte erneute Zugabe von 165 g Glycin, Zentrifugieren und Lösen mit Natriumzitrat in der oben beschriebenen Weise. Anschließend wurde ein drittes Mal 165 g Glycin zugefügt, 30 Minuten gerührt, dann 45 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert und das Sediment in 180 ml 0,055 m Natriumzitratlösung gelöst. Diese Lösung wurde nun 2 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert, das Präzipitat verworfen.

Der Überstand stellte die fertige Fibrinogenlösung dar, die auf 15°C abgekühlt, durch ein weiches Faltenfilter filtriert und in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren wurde. Vor Verwendung des Fibrinogens zu Testzwecken wurde die Konzentration der Fibrinogenlösung mit der Hitzefibrinmethode bestimmt, um die benötigte 1 %ige Lösung herstellen zu können. Außerdem wurde jeweils eine kleine Probe 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen

gelassen. Präparate, die zu diesem Zeitpunkt Teilgerinnung erkennen ließen, wurden verworfen.

Reaktionsgemisch

Das Reaktionsgemisch wurde durch anteilmäßige Mischung folgender Lösungen hergestellt:

2 Teile	Acacia
2 Teile	$CaCl_2 \cdot H_2O$ (7 ‰) in 0,9 %iger NaCl
1 Teil	Imidazolpuffer pH 7,2 (1,75 g Imidazol in 90 ml 0,1 n HCl + 10 ml Aqua dest.)
1 Teil	2,7 %ige NaCl-Lösung

Herstellung von Rinderlungenthrombokinase (48, 63)

Die Herstellung der Thrombokinase erfolgte aus Rinderlunge, die möglichst unmittelbar nach dem Schlachten mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült wurde, um das in ihr enthaltene Blut weitgehend zu entfernen. Sodann wurde sie mit Aqua dest. gewaschen (Leitungswasser ist wegen seines relativ hohen Ca-Gehaltes unbrauchbar), die Bronchien und großen Gefäße entfernt und das übrigbleibende Gewebe in kleine Stückchen zerschnitten. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wurden die Lungenstückchen durch einen Fleischwolf gedreht. Anschließend wurde der entstandene Brei mit einem Handmixgerät noch weiter zerkleinert, ein gleiches Volumen 0,9 %iger NaCl-Lösung zugefügt und diese Mischung 20 Stunden im Kühlschrank bei 4°C unter gelegentlichem Aufrühren extrahiert.

Sodann wurde das Material durch mehrere Lagen Mull filtriert, das Filtrat verworfen und dem Rückstand erneut ein gleiches Volumen 0,9 %iger NaCl-Lösung zugegeben. Nach weiterer 24-stündiger Extraktion bei 4°C wurde das Filtrat homogenisiert und mittels Ultrazentrifuge bei 30 000 U/min 30 Minuten zentrifugiert.

Das Sediment wurde im halben Volumen 0,9 %iger Kochsalzlösung suspendiert, homogenisiert und ein zweites Mal 30 Minuten bei 30 000 U/min zentrifugiert, dann erneut im halben Ausgangsvolumen physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und homogenisiert.

Durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 2 000 U/min wurden gröbere Bestandteile der Suspension abgeschieden. Der Überstand stellte die gebrauchsfertige Thrombokinase dar. Diese wurde in kleinen Portionen (5 ml) in der Tiefkühltruhe bei -20°C eingefroren und bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Vor der Verwendung im Prothrombintest wurde erneut kurzzeitig homogenisiert und diejenige Thrombokinasekonzentration bestimmt, welche im Testsystem die kürzeste Gerinnungszeit erbrachte. Mit der so gefundenen Verdünnung wurden die Aktivitätsbestimmungen durchgeführt.

Bestimmung der spezifischen Aktivität von Prothrombin-Reinpräparaten

Sie beruht auf der Tyrosinbestimmung nach Folin und Ciocalteu (12). Die Bezugskurve zur Ermittlung der Tyrosinkonzentration aus dem Extinktionswert zeigt die Abbildung 6. Aus dem Quotienten von Einheitenzahl/ml und mg Tyrosin/ml ergab sich die spezifische Aktivität der getesteten Präparate.

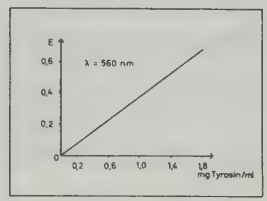

Abb. 6: Diagramm zur Bestimmung des Tyrosingehaltes eines Präparates bei bekannter Extinktion E der zu bestimmenden Lösung

C. Thrombin und Autoprothrombin C: Herstellung und Aktivitätsbestimmung

Herstellung (22, 45, 48)

Durch Zugabe von Calciumionen, Thrombokinase und Acceleratorglobulin zu gereinigtem Prothrombin wird dessen Umwandlung in Thrombin und Autoprothrombin C bewirkt. Versuchsansatz:

Gereinigtes Prothrombin (ca. 20 000 E/ml, spez. Aktivität über 30 000 E/mg Tyrosin)	17,0 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (imidazolgepuffert, pH 7,0) 0,32 m	3,2 ml
Thrombokinase	15,0 ml
Gereinigtes Acceleratorglobulin	0,4 ml
0,9 %ige NaCl-Lösung	4,4 ml

Die quantitative Umwandlung von Prothrombin in Thrombin bei Zimmertemperatur wurde durch laufende Thrombintestungen überprüft. Nach etwa 30 Minuten war die höchste Thrombinkonzentration erreicht. Zur Abtrennung der Thrombokinase wurde nun 90 Minuten bei 30 000 U/min zentrifugiert, der Bodensatz verworfen und das im Überstand befindliche Thrombin-Autoprothrombin C-Gemisch auf eine äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (ϕ 1 cm, Cellulose-Ionenaustauscher, Typ DEAE-GS) aufgebracht. Anschließend wurde mit folgenden Phosphatpuffern eluiert:

1)	0,05 m	pH 7,0
2)	0,1 m	pH 7,88
3)	0,4 m	pH 8,2

Das Eluat enthielt bei Puffer 1 das Thrombin. Mit Puffer 2 kamen verunreinigende Substanzen von der Säule, und mit Puffer 3 wurde das Autoprothrombin C eluiert. Mit den angegebenen Puffern wurde jeweils so lange nachgewaschen, bis die Eiweißkonzentration im Eluat annähernd 0 war. Die Bestimmung dieser Konzentration wurde mit einem LKB-Uvicord II vorgenommen, das mit einem LKB-Fallbügelschreiber verbunden war.

Die Einengung des thrombinhaltigen Anteils erfolgte durch Zugabe von kristallinem Ammoniumsulfat (1 g pro 2 ml Lösung) bei 0°C unter ständigem Rühren. Dabei fiel das Thrombin aus. Es ließ sich durch Zentrifugieren (15 Minuten, 6000 U/min, 0°C) als Bodensatz abtrennen. Das Sediment wurde in einer geringen Menge Aqua dest. gelöst und etwa eine Stunde bei 0°C gegen Aqua dest. dialysiert, die Endkonzentration bestimmt und das Präparat bei -20°C eingefroren.

Um das Autoprothrombin C zu erhalten, war zunächst das im Puffer vorhandene Phosphat bei 0°C zum Auskristallisieren zu bringen und durch Zentrifugieren zu entfernen. Das weitere Vorgehen entsprach dem zur Isolierung des Thrombin.

Bestimmung der Thrombinaktivität (45)

Unter einer Thrombineinheit (Iowa-Einheit) versteht man diejenige Menge Thrombin, die 1 ml einer 1 %igen Standard-Fibrinogenlösung bei 28°C in 15 Sekunden zur Gerinnung bringt.

Die zu bestimmende Thrombinlösung wurde jeweils so verdünnt, daß sich in einem Ansatz der folgenden Zusammensetzung:

1 %ige Fibrinogenlösung	0,1 ml
Reaktionsgemisch	0,3 ml
Verdünnte Thrombinlösung	0,1 ml

eine Gerinnungszeit von etwa 15 Sekunden ergab. Bei geringen Abweichungen von diesem Wert war der sich aus einer von SEEGERS (45) aufgestellten Tabelle ergebende Korrekturfaktor zu berücksichtigen. Der Endwert ergab sich aus der Multiplikation von Korrekturfaktor und Verdünnungsgrad der Thrombinlösung mal 5 (5 = Verdünnungsgrad im Reaktionsansatz).

Bestimmung der Autoprothrombin - C - Aktivität (7)

In Gegenwart von Lipoiden, Serumacceleratorglobulin und optimaler Calciumionenkonzentration ist die Zeit, in der Prothrombin zu Thrombin aktiviert wird, abhängig von der zugegebenen Menge Autoprothrombin C.

Es wurde deshalb in einem standardisierten System die Entwicklung von Thrombin beobachtet und hieraus auf die Autoprothrombin-C-Aktivität geschlossen. Der Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Gereinigtes Prothrombin (4500 E/ml)	0,4 ml
"Crude cephalin" -Suspension, 0,4 %ig	0,2 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,32 m, imidazolgep., pH 7,2	0,1 ml
zu bestimmende Autoprothrombin-C-Lsg.	0,2 ml

Das gereinigte Prothrombin wurde als letzter Bestandteil zugegeben, anschließend im Abstand von 8, 12, 16 und 20 Minuten das entstandene Thrombin bestimmt. Die sich so ergebende Thrombinbildungskurve wurde mit der nebenstehenden graphischen Darstellung (Abb. 7) verglichen und festgestellt, welchem Kurvenverlauf die im Versuchsansatz ermittelten Thrombinaktivitäten entsprachen. Um möglichst genaue Werte der Autoprothrombin-C-Aktivität zu erhalten, wurde die unbekannte Autoprothrombin-C-Lösung so verdünnt, daß sich ein Faktor zwischen 2 und 8 ergab.

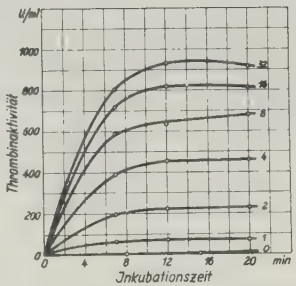

Abb. 7: Bezugskurve zur Faktorbestimmung bei der Messung der Autoprothrombin-C-Aktivität.

Die Autoprothrombin-C-Aktivität errechnet sich wie folgt:

Verdünnung der unbekannten Autoprothrombinlösung mal ermittelter Faktor mal 6 (6 = Verdünnung im Standardansatz) = Einheiten Autoprothrombin-C pro ml zu bestimmender Lösung.

D. Prethrombin und Autoprothrombin III: Herstellung und Aktivitätsbestimmung

Herstellung

Durch Zugabe von Thrombin zu Prothrombin bei pH 7, 0 erhält man eine Umwandlung von Prothrombin in Prethrombin und Autoprothrombin III (52). Das Thrombin wird bei dieser Reaktion nicht verbraucht.

Der Ablauf der Aktivierung entsprach weitgehend dem bei der Gewinnung von Thrombin und Autoprothrombin C. Das Reaktionsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

Gereinigtes Prothrombin (ca. 30 000 E/ml, spezifische Aktivität über 30 000 E/mg Tyrosin)	10, 0 ml
Thrombin (3 200 E/ml)	6, 0 ml
Phosphatpuffer (0, 05 m, pH 7, 0)	14, 0 ml

Die Umwandlung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt; sie war nach etwa 1 1/2 Stunden beendet. Dies wurde durch Überprüfung der Aktivitätsabnahme des Prothrombins kontrolliert.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Gemisch direkt auf eine äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (ϕ 1 cm, Höhe 10 cm, Celluloseionenaustauscher, Typ DEAE-SH) aufgebracht und unter Druck mit folgenden Phosphatpuffern eluiert:

1)	0, 05 m,	pH 7, 0
2)	0, 075 m,	pH 7, 2
3)	0, 175 m,	pH 7, 4
4)	0, 4 m,	pH 8, 2

Bei Puffer 1 wurde hierbei das Thrombin und etwaige Reste von Prothrombin ausgewaschen, mit Puffer 2 erschien das Prethrombin, mit Puffer 3 ein "Inhibitor" und mit Puffer 4 das Autoprothrombin III. Die weitere Aufbereitung erfolgte beim Prethrombin wie bei der Gewinnung von Thrombin, bei "Inhibitor" und Autoprothrombin III analog dem Vorgehen bei der Autoprothrombin-C-Reinigung.

Bestimmung der Prethrombinaktivität (34)

Prethrombin wird durch Zusatz von Autoprothrombin C, Acceleratorglobulin, Cephalin und Acacia-Calcium-Mischung in Thrombin übergeführt. Das entstandene Thrombin wird dann im Thrombintest bestimmt. Das Reaktionsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

Acacia-Ca-Mischung	1,9 ml
"Crude cephalin", 0,07 %ig	0,9 ml
Autoprothrombin C (10-20 E/ml)	0,1 ml
Acceleratorglobulin	0,1 ml
zu bestimmende Prethrombinlösung	1,0 ml

Um keine zu großen Mengen an Prethrombin im Test zu benötigen, wurde die Prethrombinlösung bereits vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch verdünnt. Diese verdünnte Prethrombinlösung wurde dem Reaktionsgemisch zuletzt zugesetzt und dann in Minutenabständen die Einheitenzahl des sich entwickelnden Thrombin bestimmt. Das Maximum war im allgemeinen nach etwa 10 Minuten erreicht. Die im Präparat enthaltene Prethrombinaktivität (E/ml) berechnete sich wie folgt:

Maximale Thrombineinheitenzahl mal Verdünnungsfaktor mal 4 (4 = Verdünnung im Reaktionsansatz) = Prethrombineinheiten pro ml der zu bestimmenden Lösung.

Nachweis der Autoprothrombin-III-Aktivität (37)

Autoprothrombin III wurde durch Russel-Viperngift (Stypven) in Gegenwart von Ca^{++} in Autoprothrombin C übergeführt und die resultierende Autoprothrombin-C-Wirkung an einem standardisierten System geprüft. Die Autoprothrombin-III-Bestimmung wurde nur qualitativ durchgeführt. Grund hierfür war, daß im standardisierten System eine Abhängigkeit der Gerinnungszeiten vom Prothrombingehalt festgestellt worden war, weshalb eine exakte Angabe der Autoprothrombin-III-Aktivität nicht möglich erscheint (siehe Ergebnisteil, S. 42). Um Autoprothrombin quantitativ zu substituieren, wurde das Zymogen in einer Menge zugegeben, wie sie der bei der Umwandlung von Prothrombin in Prethrombin und Autoprothrombin III gewonnenen Einheitenzahl an Prethrombin anteilsmäßig entsprach.

Zur Testung wurde das folgende Reaktionsgemisch in der aufgeführten Reihenfolge zusammengegeben:

0,9 %ige NaCl, imidazolgepuffert, pH 7,2 (1 Teil Puffer, 9 Teile 0,9 %ige NaCl)	1,65 ml
Stypven, 0,1 mg/ml	0,05 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,25 m	0,20 ml
zu bestimmende Autoprothrombin-III-Lösung	0,10 ml

Zugleich mit der Zugabe der zu untersuchenden Autoprothrombin-III-Lösung wurde eine Stoppuhr in Gang gesetzt und alle 30 Sekunden, beginnend nach 2 Minuten, die Gerinnungszeit in folgendem Testansatz bei 37°C bestimmt:

Reaktionsmischung	0,10 ml
Rinderoxalatplasma (Plasma aus 9 Teilen Vollblut + 1 Teil 1,85 %iges Natriumoxalat, verdünnt mit gleicher Menge gepufferter 0,9 %iger NaCl)	0,20 ml
"Crude Cephalin", 0,1 %ig	0,10 ml

Die kürzeste Gerinnungszeit wurde nach etwa 3 - 5 Minuten erhalten. Zuvor war bereits in einem Leeransatz (0,1 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung an Stelle der Reaktionsmischung im standardisierten Ansatz) die Gerinnungszeit bestimmt worden. Ergab sich nun bei Zugabe des fraglichen Autoprothrombin III eine deutlich kürzere Gerinnungszeit, so bedeutete dies - bei negativem Ausfall des Autoprothrombin-C-Testes mit der zu bestimmenden Autoprothrombin-III-Lösung - den qualitativen Beweis für das Vorhandensein von Autoprothrombin III.

Herstellung von Acceleratorglobulin (3)

Zur Bestimmung der Prethrombinaktivität ist die Zugabe von Acceleratorglobulin zum Reaktionsgemisch erforderlich, so daß sich die Isolierung dieses Plasmabestandteiles im Rahmen der vorliegenden Arbeit als notwendig erwies.

Hierzu wurde frisches, durch Zugabe von 1,85 %iger Kaliumoxalatlösung ungerinnbar gemachtes Blut (9 Teile Blut, 1 Teil Antikoagulans) verwendet. Ein Liter des durch Zentrifugation gewonnenen Plasmas wurde mit 40 g Bariumcarbonat gemischt und 10 Minuten gerührt, anschließend zentrifugiert (15 Minuten, 6000 U/min), der Bodensatz verworfen, der Überstand erneut an 40 g Bariumcarbonat 30 Minuten adsorbiert und der Überstand durch Zentrifugieren (20 Minuten bei 6000 U/min) zurückgewonnen. Dem Überstand wurden 5 l auf 0°C vorgekühltes Aqua dest. zugegeben, das pH mit 1 %iger Essigsäure auf 6,1 - 6,2 eingestellt und das Präzipitat durch 20-minütiges Zentrifugieren (3000 U/min) bei 0°C abgetrennt und verworfen.

Der Überstand wurde durch 1 %ige Essigsäure auf ein pH von 5,0 - 5,1 eingestellt, das ausgefällte Material 20 Minuten bei 3000 U/min und 9°C zentrifugiert und der Bodensatz mit einem Homogenisator in 1 l auf 0°C vorgekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung, die mit 30 ml 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,0, versetzt worden war, suspendiert.

Es folgte Fraktionierung mit Ammoniumsulfat. Bei -2°C wurde der Lösung 282 g Ammoniumsulfat zugegeben und etwa 10 Minuten gerührt, bis sich alles Salz gelöst hatte. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation (9°C, 6000 U/min, 15 Minuten) gesammelt, der Überstand verworfen.

Das Präzipitat wurde in etwa 20 ml Aqua dest. gelöst, die Lösung bei 0°C gegen Aqua dest., dem zur Neutralisation auf je 10 l Aqua dest. 1 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung zugegeben war, so lange dialysiert, bis ein spezifischer Widerstand von 1000 Ohm · cm in der Proteinlösung erreicht war.

Der pH-Wert dieser Lösung wurde durch Zugabe von 1 %iger Essigsäure auf pH 6,3 - 6,4 eingestellt. Es folgte 15-minütiges Zentrifugieren bei 6000 U/min (0°C). Das Sediment wurde verworfen, das pH durch weitere Essigsäurezugabe auf pH 5,2 gebracht und das Präzipitat, welches das aktive Material enthielt, durch Zentrifugieren (20 Minuten bei 6000 U/min) gewonnen.

Das Endpräparat wurde durch Lösen dieses Präzipitates in 0,88 m Calciumchlorid, dem abschließend ein der $CaCl_2$-Lösung gleiches Volumen Glycerin zugegeben wurde, hergestellt. Die Aufbewahrung der Acceleratorglobulinlösung erfolgte in der Tiefkühltruhe bei -20°C.

Gewinnung von "crude cephalin" (7)

"Crude cephalin" wurde zur Bestimmung der Aktivität von Prethrombin, Autoprothrombin C und Autoprothrombin III benötigt. Man gewinnt es durch Ätherextraktion der durch Aceton getrockneten grauen Substanz von Kälberhirn.

Hierzu wurde ein Kalbshirn von der weißen Substanz und den Meningen befreit, gründlich in Wasser gespült, in kleine Stücke geschnitten und mit einem Mörser in Aceton verrieben. Das Aceton wurde fünfmal wieder abgegossen und durch frisches ersetzt. Nach dem letzten Abgießen wurde die Hirnsubstanz ausgebreitet und an der Luft vollständig getrocknet.

Dann wurde das Material pulverisiert und mit 300-400 ml Äther 2 - 3 Tage unter gelegentlichem Aufschütteln in der Dunkelheit bei 4°C extrahiert, der Extrakt gefiltert, das Filtrat in einen Verdampfer gebracht und der Äther verdampft. Das rohe Lipoid wurde zweimal mit Aceton gewaschen, das Aceton jeweils dekantiert. Nach Lufttrocknung wurde das Lipoid gewogen, in 0,9 %iger NaCl aufgeschwemmt, die Suspension je nach weiterem Verwendungszweck verdünnt, homogenisiert und bei -20°C aufbewahrt. Vor dem eigentlichen Gebrauch mußte jeweils noch einmal kurz homogenisiert werden.

E. Proteintrennungsverfahren: Säulenchromatographie, Celluloseacetatelektrophorese, Elektrofokussierungsverfahren

Säulenchromatographische Auftrennung von Prothrombin an DEAE-Cellulose (26, 27, 30)

Celluloseacetat-Ionenaustauscher DEAE-GS (Kapazität 0,55) wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und in eine Glassäule von 1 cm ⌀ bis zu einer Höhe von 25 cm eingefüllt. Ein hochkonzentriertes Prothrombinprä-

parat (490 000 E gesamt, spezifische Aktivität 32 000 E/mg Tyrosin), das in 0,025 m Trispuffer, pH 8,4 gelöst war, wurde auf die über Nacht äquilibrierte Säule gebracht und mit den Trispuffern A-G, deren Zusammensetzung bei den Angaben zu den verwendeten Puffern auf Seite 27 aufgeführt ist, nachgespült. Die Eiweißkonzentration in den einzelnen durch die Puffer eluierten Fraktionen wurde durch Extinktionsmessung mittels LKB-Uvicord II und Fallbügelschreiber ermittelt. Die Fraktionen wurden getrennt gesammelt, durch Zugabe von Ammoniumsulfat (1 g je 2 ml) ausgefällt und in etwas Aqua dest. gelöst. Durch Acetonfällung wurde der noch hohe Salzgehalt weiter verringert und die so eingeengten Fraktionen auf ihre Aktivität an Prothrombin, Prethrombin, Autoprothrombin C und Autoprothrombin III geprüft.

Celluloseacetat-Elektrophorese (18)

Die sog. Cellogel-Elektrophorese wurde mit Veronalpuffer, 0,1 m, pH 8,6 und 0,1 m, pH 6,8 durchgeführt. Die Auftrennung selbst wurde unter Gleichstromspannung von 200 Volt vorgenommen, die Wanderungszeit betrug eine Stunde.

Das Elektrophoreseverfahren ist an sich allgemein bekannt, so daß sich ein Eingehen auf den gesamten Versuchsablauf erübrigt. Auf ein paar Einzelheiten jedoch, die unbedingt zu beachten sind, will man vergleichbare Elektrophoresebilder erhalten, sei eingegangen.

Wichtig ist zunächst einmal die richtige Aufbringung der zu analysierenden Lösung. So muß man mit einem Bleistift die Startlinie (etwa 2,5 cm Abstand vom Streifenanfang) markieren und dicht parallel in Wanderungsrichtung neben (!) ihr die Lösung auftragen, weil bei direktem Aufbringen auf dem Markierungsstrich wegen der dort veränderten Kapillarverhältnisse,die durch die Kompression der weichen Cellogelstreifen durch den Bleistiftdruck hervorgerufen werden, eine Beeinflussung der Proteinwanderung möglich ist.

Nach der Auftrennung folgte in üblicher Weise die Färbung der Cellogelstreifen mit Amidoschwarz und dann deren Trocknung bei 60°C, die einen weiteren schwierigen Punkt im Elektrophoreseverfahren darstellt, der nun geschildert werden soll. Hierzu wurde eine Glasplatte auf 60°C vorgewärmt, auf sie der tropfend nasse Streifen aufgelegt - dabei durften sich zwischen

Streifen und Glasplatte keine Luftblasen bilden, da er sonst an diesen Stellen nicht transparent wurde - und dann die Glasplatte mit dem Cellogelstreifen in den Wärmeschrank gelegt. Sobald der Streifen durchsichtig war, wurde er von der Glasplatte abgehoben, zwischen zwei Seiten saugfähigen Papiers gelegt und unter Druck getrocknet. Ließ man die Streifen zu lange im Wärmeschrank, so kam es zu Verziehungen, die sich nicht mehr beseitigen ließen. Zur Bewertung des Elektrophoresebildes wurden die Streifen abschließend auf rein weißes, starken Kontrast gebendes Papier aufgezogen.

Elektrofokussierungsverfahren

Das Elektrofokussierungsverfahren (Dichtegradienten-Elektrophorese) beruht auf einem von VESTERBERG und SVENSSON (61) erstmals beschriebenen Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen in einem kombinierten Dichte- und natürlichen pH-Gradienten. Die Proteine durchlaufen in einem angelegten elektrischen Feld unter zunehmendem Ladungsverlust die stetig sich ändernden pH-Bereiche und bleiben schließlich als scharf konturierte Zone bei ihren isoelektrischen Punkten liegen.

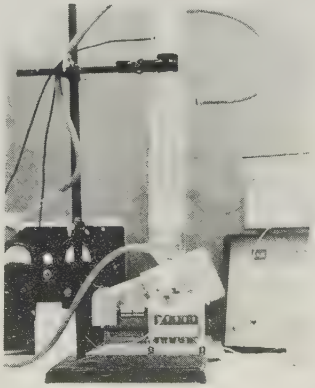

Abb. 8: Elektrofokussierung, Versuchsanordnung (näheres siehe nebenstehender Text)

Zu den Versuchen wurde eine Ampholine-Elektrofokussierausrüstung LKB 8101 verwendet. In der innen und außen von Kühlflüssigkeit umspülten Kammer (0°C) einer zylindrischen Glassäule (Fassungsvermögen 110 ml) wurde der kombinierte Dichte- und pH-Gradient nach den Angaben der Herstellerfirma durch Übereinanderschichten von 24 gleichen Einzelvolumina verschieden konzentrierter Gemische aus 20 %iger Saccharoselösung und 1,2 %iger Ampholine-Trägerampholyt-Lösung aufgebaut. Verwendet wurde ein Ampholyt des Trägerbereiches pH 3 - 6. Zur Vermeidung einer Oxidation des Trägerampholyten an der Anode bzw. einer Reduktion an der Kathode wurden die an den Enden der Säule angebrachten Elektroden mit Säure bzw. Base umgeben.

Kleine Mengen der zu untersuchenden Prothrombinpräparate wurden beim Beschicken der Säule einer dem oberen pH-Bereich der Säule zugeordneten

Fraktion des Trägergemisches durch Austausch mit einer entsprechenden Menge der Ampholytlösung beigegeben. Um die Proteinkonzentration niedrig zu halten, mußte gelegentlich mit Ampholytlösung aus zwei benachbarten Fraktionen ausgetauscht werden.

An die Elektroden der fertig vorbereiteten Säule wurde eine Gleichspannung von anfänglich 400 V angelegt, die dann auf 500 V langsam gesteigert wurde. Nach 68-stündiger Versuchsdauer waren die Endpunkte der Proteinwanderung sicher erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte unter fortlaufender pH-Kontrolle die gleichmäßige Entleerung der Säule mittels Sigmapumpe sowie die kontinuierliche automatische Messung und Aufzeichnung der Proteinkonzentration mittels Uvicord II und Fallbügelschreiber LKB 6520 A. Bei der Auswertung war die Leerkurve zu berücksichtigen. Aus den getrennt aufgefangenen Fraktionen wurde das fein präzipitierte Protein durch Zentrifugieren sedimentiert, der Niederschlag in Aqua tridest. bei pH 7,2 gelöst, und bis zur Erreichung eines spezifischen Widerstandes von mindestens 1000 Ohm · cm gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend analysiert.

Bei diesen Versuchsansätzen zeigten sich hohe Aktivitätsverluste. Zur Feststellung des Bestandteiles des Trägergemisches, der diesen Verlust verursacht, wurden Lösungen hergestellt, die in etwa der in der Säule vorliegenden Konzentration der Einzelbestandteile entsprachen (Tab. 1).

Tabelle 1

Lösungen, die hergestellt wurden, um das beim Elektrofokussierungsverfahren hohe Aktivitätsverluste an Prothrombin verursachende Agens zu ermitteln.

Lösung	Art der Lösung	Substanzmenge bzw. -volumen	aufgefüllt mit Aqua dest. auf
1	physl. NaCl	0,009 g	10,0 ml
2	Saccharose	2,0 g	8,0 ml
3	Glyzerin	2,0 ml	8,0 ml
4	Ampholyt	1 ml 10 %ig	9,2 ml
5	Na-formiat	1 ml 10 %ig	9,2 ml

Die physiologische Kochsalzlösung diente als Vergleichslösung. Je 1,0 ml einer Prothrombinlösung (15 720 E/ml, spezifische Aktivität 34 000 E/mg Tyrosin) wurden zu je 8 ml der in der Tabelle angegebenen Lösungen gegeben und im Kühlschrank (4 ^{o}C) aufbewahrt. Gelegentlich wurden die Lösungen aufgeschüttelt und deren Aktivität dann nach 1, 7, 23, 30, 47, 55 und 168 Stunden bestimmt.

F. Technik der Tierversuche

Kaninchen von 2,1 - 3,2 kg Körpergewicht erhielten vorbereitend 6 mg Markumar pro kg Körpergewicht oral verabreicht. Nach drei Tagen war der Prothrombinspiegel im Blut der Tiere auf 5 - 10 % der Norm abgesunken. An diesen Tieren wurde die substituierende Wirkung der Prothrombinderivate Autoprothrombin III und Prethrombin, insbesondere in Hinblick auf die Vorgänge an der Gefäßwand, überprüft.

Dazu wurden am Abend des dritten Tages nach der Markumarverabreichung je nach Versuchsanordnung entweder eines der beiden Zymogene oder Autoprothrombin III und Prethrombin kombiniert in die Ohrvene injiziert,, und zwar in Mengen, die auf Grund vorausgegangener Aktivitätsbestimmung zur Substitution des fehlenden tiereigenen Prothrombins als voll ausreichend anzusehen waren.

Am nächsten Morgen erfolgte nach operativer Vorbereitung der mit Nembutal (35 mg/kg, i.v.) narkotisierten Versuchstiere 1. die Bestimmung von Prothrombin, Prethrombin und Autoprothrombin III im arteriellen Blut, sowie 2. die intravitalmikroskopische Beurteilung der Permeabilitäts- und Resistenzverhältnisse an der mesenterialen Endstrombahn durch Herrn Priv. Doz. Dr.G.Hauck. Die hierbei verwendete Technik ist an anderer Stelle (15) beschrieben.

G. Geräte, Lösungen, Reagentien

Verwendete, im Text nicht näher beschriebene Geräte

1. LKB Uvicord II 8300 A (λ = 280 nm)
2. LKB Fallbügelschreiber 6520 A
3. Homogenisator Ultra-Turrax TP 18/2
4. pH-Messung: Pusl-pH-Meter, Typ 12 S
5. Leitfähigkeitsmeßgerät WTW Type LBR
6. Dialyse mit Kalle-Dialysierschläuchen, Breite 20 mm und 30 mm
7. Kühlung: Colora-Ultrakryostat KT 40 S
8. Zentrifuge: Christ Junior, Rotor 5550, 3000 U/min $\sim$ 14 900 g
   6000 U/min $\sim$ 46 500 g
9. Ultrazentrifuge: Spinco, Mod.L, Roter Typ 50, 30 000 U/min $\sim$ 78 400 g

Im Text nicht näher beschriebene Lösungen und Reagentien

a) Pufferlösungen:

Phosphatpuffer

0,05	m	pH 7,0	2,691 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 4,331 Na_2HPO_4 Aqua dest. ad 1 000
0,1	m	pH 7,88	1,0072 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 13,052 Na_2HPO_4 Aqua dest. ad 1 000
0,4	m	pH 8,2	1,712 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 54,637 Na_2HPO_4 Aqua dest. ad 1 000
0,075	m	pH 7,2	1 Teil 0,3 m pH 8,0 + 9 Teile 0,05 m, pH 7,0;
0,3	m	pH 8,0	2,194 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 40,333 Na_2HPO_4 Aqua dest. ad 1 000
0,175	m	pH 7,45	5 Teile 0,3 m pH 8,0 + 5 Teile 0,05 m pH 7,0

Veronalpuffer

0,1	m	pH 8,6	4,405 g Veronal, 24,605 g Veronal-Natrium, Aqua dest. ad 4 000
0,1	m	pH 6,8	Lösung A: 20,62 g Veronal-Natrium, aq. Lösung B: 1/10 n HCl dest. ad 1 000 47,8 ml Lsg. B + 52,2 ml Lsg. A ergeben den gewünschten Puffer

Tris-Puffer

Standardlösung I: 24,2 g Tris/l = 0,2 m
Standardlösung II: 48,4 g Tris/l = 0,4 m

A	0,025	m	pH 8,4	25 ml Standard I + 17,5 ml 1/10 n HCl, Aqua dest. ad 200
B	0,1	m	pH 7,5	50 ml Standard I + 8,12 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 100
C	0,15	m	pH 7,0	37,5 ml Standard II, 13,5 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 100
D	0,2	m	pH 7,0	50,0 ml Standard II, 18,0 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 100
E	0,3	m	pH 7,0	36,8 g Tris, 270 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 1 000
F	0,4	m	pH 7,0	48,4 g Tris, 360 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 1 000
G	0,6	m	pH 7,0	72,6 g Tris, 540 ml 1 n HCl, Aqua dest. ad 1 000

b) Reagentien:

Ampholine Carrier Ampholytes, pH 3-5, LKB-Produkter AB, Stockholm-Bromma 1, Schweden
Cellulose Ionenaustauscher, Type DEAE - GS, Kapazität 0,55
Type DEAE - SH, Kapazität 1,23
Serva Entwicklungslabor Heidelberg
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, E. Merck, Darmstadt
Glycin Gl 127, Schuchardt, München
Gummi, arabisch, ausgelesen, fein gepulvert, E. Merck, Darmstadt
Mg-OH-Paste Hydromagma, Merck Chemical Division, Rahway, New Jersey, USA
Polywachs (Polyaethylenglycoll) 40 000, Serva Entwicklungslabor Heidelberg
Tri-n-(butyl)Phosphat ($C_{12}H_{27}O_4P$), E. Merck, Darmstadt
Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$), E. Merck, Darmstadt
Russel Viper venom (Stypven), Burroughs Wellcome u. Co., London.

III. Versuchsergebnisse

A. Prothrombinisolierung

Zur Isolierung des Prothrombin haben neben der Immunpräzipitationstechnik (57) insbesondere Methoden Bedeutung erlangt, deren Prinzip auf der isoelektrischen Fällung bei verschiedenen pH in Verbindung mit Adsorption an Bariumsulfat (10, 13, 58), Bariumzitrat (29, 36) oder Betonite (56) mit anschließender Desorption beruht. Ein Verfahren, mit dem Präparate erhalten werden, die ohne zusätzliche präparative Säulenchromatographie nahezu idealen Reinheitsgrad besitzen, wurde von SEEGERS (42, 43, 51) beschrieben. Diese Methode kam bei den hier beschriebenen Versuchen mit einigen Abänderungen, über die im folgenden berichtet wird, zur Anwendung.

Außerdem wurde ein Verfahren erprobt, das, ebenfalls im SEEGER'schen Labor entwickelt, bislang noch unveröffentlicht, mit einigen Modifikationen versehen kürzlich beschrieben wurde (2). Es handelt sich hierbei um eine Methode, bei der die Ammoniumsulfatfällung durch ein Dialyseverfahren ersetzt ist.

Ausbeute und Reinheitsgrad im "Dialyseverfahren"

Bei einer Reihe von Versuchen zur Reindarstellung von Prothrombin wurde das zuletzt genannte Verfahren angewendet. Die erhaltenen Präparate waren, wie die folgende Übersicht (Tabelle 2) zeigt, als mäßig einzustufen.

Tabelle 2

Reindarstellung von Prothrombin; erreichte Ergebnisse im "Dialyseverfahren" (3 Versuchsansätze)

Präparat Nr	3	4	5
Gesamtaktivität, E	67 500	70 000	100 000
spez. Aktivität (E/mg Tyrosin)	3 554	2 674	3 231

Auf die Ursachen des relativ geringen Reinheitsgrades dieser Präparationen sei kurz eingegangen. Beim Prothrombinisolierungsverfahren handelt es sich um eine Vielzahl aufwendiger Einzelschritte, in denen das aktive Material eingeengt wird (Zeitaufwand für die Herstellung eines Präparates ca. 60 Stunden). Naturgemäß kommt einzelnen Schritten der Isolierung - von der Präparationstechnik her gesehen - eine besondere Bedeutung zu. Beim "Dialyseverfahren" ist dies der Schritt im Anschluß an die Desorption, also an dem Punkt, wo das "Dialyseverfahren" und die Methode, bei der die Ammoniumsulfatfällung angewendet wird, voneinander abweichen; für diese Einstellung des Desorbates auf pH 6,4 wurden 4 - 6 Stunden benötigt, weil es bei zu rascher Salzsäurezugabe zu sehr starker, die Aktivität mindernder Schaumbildung kam. Die sich anschließende Dialyse der auf pH 6,4 eingestellten Proteinlösung beanspruchte weitere 8 - 13 Stunden, bis der geforderte spezifische Widerstand von 1500 Ohm · cm in der Lösung erreicht war. Insgesamt lag also die zur pH-Einstellung und Dialyse benötigte Zeit bei etwa 15 Stunden.

In den weiteren Versuchsansätzen zeigte es sich dann, daß der Schlüssel zur Gewinnung besserer Präparate bei der pH-Einstellung auf pH 6,4 lag. Durch Zugabe weniger Tropfen Tri-n-butylphosphat (zur Eindämmung der Schaumbildung) und durch exakte Kühlung der Proteinlösung durch einen Eismantel, mit dem das Mischgefäß umgeben wurde, konnte nämlich die Einstellung schonender und mit verkürztem Zeitaufwand (ca. 2 Stunden) durchgeführt werden. Um die eingesparte Zeit wurde dann, weil sich eine Abhängigkeit der Reinheit der Präparate vom in der Dialyse erreichten Widerstand zeigte, die Dialyse verlängert.

Obwohl die Gesamtzeit sich also nicht veränderte, konnte durch diese Modifikationen eine signifikante Verbesserung der Versuchsergebnisse erreicht werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3
Reindarstellung von Prothrombin; erreichte Ergebnisse im "Dialyseverfahren" nach Modifizieren der Methodik (drei Versuchsansätze)

Präparat Nr.	8	9	11
Gesamtaktivität, E	188 000	253 000	340 000
spez. Aktivität (E/mg Tyrosin)	18 264	19 195	16 072

Im weiteren - insgesamt wurden 20 Ansätze mit je 3 Liter Plasma nach dem "Dialyseverfahren" durchgeführt - konnte keine Aktivitätssteigerung mehr erzielt werden. Dies deutete daraufhin, daß mit diesem Verfahren keine wesentlich besseren Ergebnisse mehr zu erwarten waren. Bestätigt wurde diese Annahme durch die oben erwähnte Arbeit (2), in der von Versuchsansätzen berichtet wird, in denen zwar höhere als die hier erzielten spezifi-

schen Aktivitäten erreicht werden konnten, die aber doch noch deutlich unter den bereits mit der "Ammoniumsulfatmethode" erhaltenen Ergebnissen lagen. Deshalb wurden in der Folge eine Reihe von Versuchen mit der "Ammoniumsulfatmethode" angeschlossen und versucht, durch Änderungen an dem bislang üblichen Präparationsverfahren eine Steigerung der spezifischen Aktivität des gewonnenen Prothrombins zu erreichen.

Ausbeute und Reinheitsgrad im "Ammoniumsulfatverfahren"

Bereits bei der ersten Durchführung des "Ammoniumsulfatverfahrens" deutete sich eine Überlegenheit dieser Methode gegenüber dem "Dialyseverfahren" an. Es erbrachte nämlich eine Ausbeute von 160 000 E bei einer spezifischen Aktivität von 23 245 E/mg Tyrosin; das Präparat lag also im Reinheitsgrad schon deutlich über dem besten der Versuchsreihe nach dem "Dialyseverfahren". Durch die Ergebnisse der folgenden Versuche (siehe Tabelle 4) wurde diese Vermutung bestätigt.

Tabelle 4
Reindarstellung von Prothrombin; erzielte Ergebnisse im "Ammoniumsulfatverfahren" (6 Ansätze)

Präparat Nr.	Aktivität, ges. aus 31 Plasma	spez. Aktivität E/mg Tyrosin
22	152 250	31 818
23	250 642	44 758
24	212 576	33 210
26	255 150	34 327
29	156 600	37 565
30	201 285	31 574

Man erkennt deutlich, daß sich die Gesamtausbeuten bei beiden Verfahren in etwa entsprechen, wenn auch der im "Dialyseverfahren" erzielte Maximalwert bei der "Ammoniumsulfatmethode" nicht erreicht werden konnte, daß aber mit letzterer Methode weit höhere spezifische Aktivitäten und damit ein wesentlich höherer Reinheitsgrad erhalten wurde.

Um nun zu überprüfen, ob nicht etwa unterschiedliches Vorgehen bei den für beide Methoden gleichen Reinigungsschritten bis einschließlich der Zerlegung des $Mg(OH)_2$ zu den verbesserten Ergebnissen geführt hatten, wurden Versuchsansätze bis zu diesem Punkt geführt und erst dann jeweils die Proteinlösung in gleiche Teile geteilt und mit der einen Hälfte die Ammoniumsulfatfällung, mit der anderen die Dialyse durchgeführt. Die ermittelten Werte der so gewonnenen Präparate bestätigen die obigen Befunde, wie die letzte Rubrik in Tabelle 5 zeigt, in der die durch Ammoniumsulfatfällung erreichte Verbesserung hinsichtlich Gesamt- und spezifischer Aktivität in % angegeben sind.

Tabelle 5
Direkter Vergleich der erzielten Ergebnisse in "Ammoniumsulfat-" und "Dialyseverfahren". Das Desorbat war halbiert und mit dem einen Teil die Reindarstellung nach dem "Dialyseverfahren", mit dem anderen nach der "Ammoniumsulfatmethode" durchgeführt worden. (Mittelwerte aus 2 Ansätzen)

	Dialysever-fahren	Ammonium-sulfatmethode	erzielte Ver-besserung (%)
Gesamtaktivität, E	46 302	59 983	29
spez. Aktivität E/mg Tyrosin	19 500	31 980	63,2

Abhängigkeit der Beschaffenheit der Endpräparate von der Versuchsdauer, der Sedimentationszeit, dem bei der Dialyse erreichten spezifischen Widerstand und dem Fällungsbereich bei der Schlußfällung

a) Versuchsdauer

Im "Dialyseverfahren" wurden für einen Isolierungsprozeß 48 bis 56 Stunden benötigt. Während dieser ganzen Zeit unterliegt das Prothrombin, da es nicht bei der optimalen Lagerungstemperatur von unter $-20^{o}C$ isoliert werden kann, einem ständigen Aktivitätsverlust, der sowohl die Gesamtaktivität als auch die spezifische Aktivität betrifft. Dies erklärt zum Teil die mit der "Ammoniumsulfatmethode" erzielten besseren Ergebnisse, denn bei ihr gelang es auf Grund der beschriebenen Zeiteinsparung nach dem Desorp-

tionsschritt, die gesamte Isolierung innerhalb von etwa 22 Stunden abzuwickeln.

Da die Wirkung der Verkürzung der Versuchsdauer nicht an einem Vergleich der beiden Verfahren gezeigt werden kann, weil die Zeitverkürzung nicht den einzigen Faktor darstellt, der zu verbesserten Ergebnissen führte, sollen im folgenden die durch die Zeiteinsparung bedingten Unterschiede an Präparaten gezeigt werden, die alle nach der "Ammoniumsulfatmethode" hergestellt wurden (Tabelle 6). In der Rubrik A ist hierbei ein repräsentatives Präparat angegeben, das nach dem im Originalverfahren (43) beschriebenen 2-Tagerhythmus hergestellt wurde, unter B findet sich der Mittelwert aus fünf Versuchen, die in eintägiger Isolierung (Ansatz 0^{oo} Uhr, Schlußfällung gegen 23^{oo} Uhr) durchgeführt wurden.

Tabelle 6
Durch Abkürzung der Versuchsdauer erzielte Verbesserungen in Ausbeute und Reinheit der Endpräparate (A = Reindarstellung nach dem Originalverfahren, B = nach Abkürzung der Versuchsdauer)

	A	B	Verbesserung B gegen A (%)
Gesamtaktivität, E	159 735	195 444	19
spez. Aktivität E/mg Tyrosin	23 245	32 878	30

Die Steigerung der Gesamtausbeute um 19 %, vor allem aber die um 30 % höhere spezifische Aktivität zeigen die Vorteile der zeitlich verkürzten Isolierung.

b) Sedimentationszeit

Der erste Schritt bei beiden Isolierungsverfahren besteht in der isoelektrischen Fällung des hochverdünnten Plasmas. Im Originalverfahren (43) wird ein pH von 5,1 - 5,2 und eine Sedimentationszeit von etwa vier Stunden empfohlen. Die Sedimentation wird in vorgekühltem Aqua dest. ausgeführt, der Bottich jedoch nicht durch weitere Maßnahmen kalt gehalten. Deshalb steigt unter der Sedimentation die Temperatur der Lösung wieder an. Wegen

des damit parallel gehenden erhöhten Aktivitätsverlustes ist eine Verlängerung der Sedimentationszeit über 4 Stunden hinaus nach dem Originalverfahren nicht statthaft. Bei den hier beschriebenen Versuchen brauchte indessen auf die Einhaltung kürzestmöglicher Sedimentationszeiten keine Rücksicht genommen zu werden, weil durch die technische Anordnung eine Temperaturkonstanz (0 - 1° C) über beliebig lange Zeit gewährleistet war. Deshalb konnte auch untersucht werden, in wieweit Veränderungen der Sedimentationsdauer die Gesamtausbeute beeinflussen.

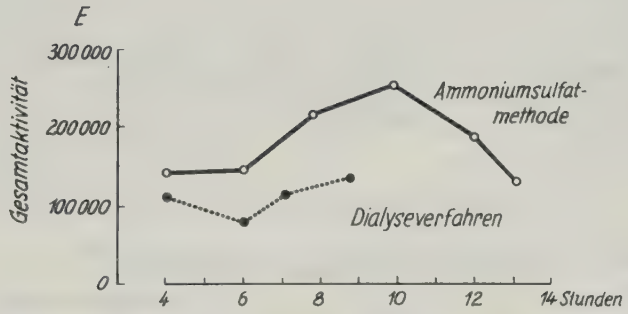

Abb. 9 *Abhängigkeit der Aktivitätsausbeute aus 3l Plasma von der Sedimentationszeit (Sedimentationshöhe 45 cm)*

Die ermittelten Zeiten sind von der Flüssigkeitshöhe im Sedimentationsgefäß abhängig. Für eine durchschnittliche Höhe von 45 cm ergaben sich die in Abb. 9 dargestellten Kurven. Die obere Kurve ("Ammoniumsulfatmethode") zeigt, daß die günstigste Sedimentationszeit bei etwa 10 Stunden liegt. Rein optisch ist der günstigste Zeitpunkt zum Abhebern des Überstandes daran zu erkennen, daß nach diesen 10 Stunden beim Absaugen über dem Bodensatz noch eine getrübte Schicht von höchstens 2 - 3 cm zu finden war. Für geänderte Sedimentationshöhen läßt sich - da die Eiweißpartikel kontinuierlich zu Boden sinken - der optimale Zeitpunkt für das Absaugen des Überstandes errechnen. Die Formel $\frac{\text{Sedimentationshöhe (cm)}}{4,5}$ gibt die günstigste Sedimentationszeit in Stunden an.

c) Spezifischer Widerstand

Als kleinsten durch Dialyse zu erreichenden spezifischen Widerstand gibt SEEGERS (43) einen Wert von 1 700 Ohm • cm an. Hieraus kann a priori auf eine Abhängigkeit der Qualität des zu isolierenden Materials vom spezifischen Widerstand des Lösungsmittels geschlossen werden.

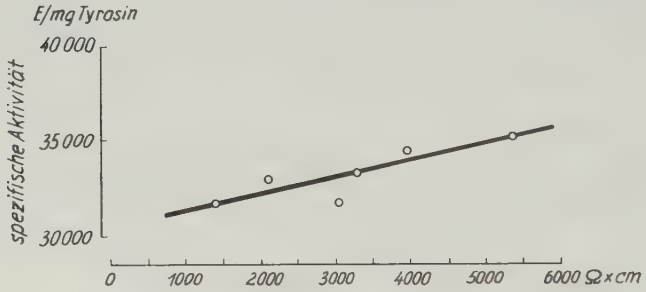

Abb. 10 *Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Endpräparates von dem bei der Dialyse erreichten spezifischen Widerstand (Ammoniumsulfatmethode)*

Die Richtigkeit dieser Annahme ergibt sich aus Abb. 10. Mit einer Erhöhung des spezifischen Widerstandes von 1500 Ohm • cm auf 5 500 Ohm • cm ging ein Anstieg der spezifischen Aktivität von annähernd 3 000 E/mg Tyrosin einher. Einer unbegrenzten Erhöhung des spezifischen Widerstandes steht jedoch entgegen, daß der Zeitaufwand für die Dialyse wieder größer wird und infolgedessen die auftretenden Aktivitätsverluste zunehmend stärker ins Gewicht fallen. Nach unseren Erfahrungen liegt die günstigste Korrelation zwischen Dialysezeit, erreichtem spezifischen Widerstand und spezifischer Aktivität des Endproduktes dann vor, wenn durch die Dialyse ein spezifischer Widerstand von ca. 6 000 Ohm • cm in der Prothrombinlösung erreicht wurde.

d) Fällungsbereich bei der Schlußfällung

Bei der abschließenden isoelektrischen Fällung wird im Originalverfahren das Prothrombin als geschlossene Fraktion in einem Bereich von pH 5,4 -

4,6 ausgefällt (43). Abbildung 11 gibt das Verteilungsspektrum des Prothrombin innerhalb dieses Bereichs wieder, das sich ergibt, wenn man die Auftrennung in pH-Schritten von 0,1 bis höchstens 0,3 vornimmt. Zusätzlich sind jeder Darstellung Angaben über den in der Dialyse erreichten spezifischen Widerstand beigefügt. Die gepunktete Kurve zeigt die spezifische Aktivität (E/mg Tyrosin), als Block dargestellt findet sich die Gesamtaktivität entsprechend den einzelnen Fraktionen in Einheiten/ml (Herstellung der Präparate nach der "Ammoniumsulfatmethode"aus jeweils 3 l Plasma).

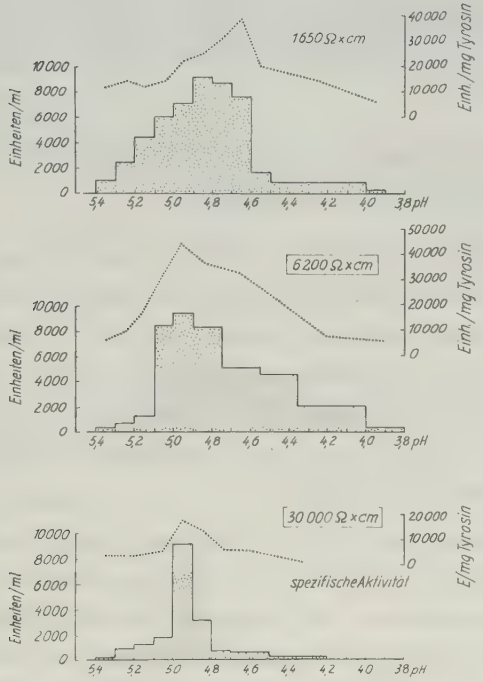

Abb.11: Schlußfällung bei der Prothrombinisolierung (Ammoniumsulfatmethode). Auftrennung in kleinen pH-Schritten. Einzelheiten siehe Text!

spezifische Aktivität

Gesamtaktivität

Der Vergleich der drei Kurvenbilder zeigt, daß mit steigendem spezifischen Widerstand das Fällungsmaximum zum Alkalischen hin verschoben und der Prothrombingipfel steiler wird. Weiterhin fällt auf, daß die mengenmäßige Verteilung des aktiven Materials mit der Verteilung der spezifischen Aktivität

parallel geht, wobei letztere im Bereich des Maximums der Proteinausfällung weit über den Werten liegt, die das bei den übrigen pH-Bereichen ausgefällte Protein aufweist.

Eine Bestätigung der Erscheinung, daß mit steigendem spezifischem Widerstand der Prothrombinlösung das Maximum der Ausfällbarkeit sich zum Alkalischen hin verschiebt, zeigte ein weiterer, einfacher Versuch, der an dieser Stelle kurz angegeben sei. Er zeigt die Umkehrung; nämlich, daß mit abnehmendem spezifischem Widerstand das Maximum der Ausfällbarkeit sich nach der sauren Seite hin verschiebt. Hierzu wurde ein bei der Endausfällung im Bereich von pH 4,9 - 5,0 gewonnenes Prothrombinpräparat aufgetaut und durch Zugabe von HCl wieder bei pH 4,9 ausgefällt. Durch Erhöhung der Ionenkonzentration in der Lösung - hierdurch erhöht sich der spezifische Widerstand - durch Zugabe von mit Imidazolpuffer auf pH 4,9 eingestellter NaCl-Lösung ging der Niederschlag sogleich wieder in Lösung. Einstellen der Lösung auf pH 4,5 ließ das Protein nicht wieder ausfallen. Erst die Zugabe weiterer Säure fällte das Prothrombin in dem jetzt bestehenden ionenreichen Milieu dann bei pH 4,3 aus.

B. Ergebnisse der Untersuchungen zur Frage der Einheitlichkeit der gewonnenen Prothrombinpräparate

Die Angabe der spezifischen Aktivität beschränkt sich auf die Aussage, wieviel Einheiten an Prothrombin in einer definierten Eiweißmenge enthalten sind. Mit steigender Einheitenzahl kann man deshalb zwar auf eine Abnahme von inaktiven, verunreinigenden Bestandteilen schließen, da man aber bisher noch keine Beziehung zwischen Molekulargewicht und Einheitenzahl herstellen kann, sagt sie nichts darüber aus, ob das jeweils vorliegende aktive Material als einheitlich zu betrachten ist oder nicht.

Um auch über die Einheitlichkeit urteilen zu können, wurden zwei Elektrophoreseverfahren herangezogen, die Celluloseacetat-Elektrophorese (18) und das Elektrofokussierungsverfahren, auch Dichtegradientenelektrophorese genannt (62). Beiden liegt das Prinzip der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zu Grunde, bei der Dichtegradientenelektrophorese wird noch zusätzlich die Erscheinung ausgenutzt, daß Eiweiße, die in einem pH-Gradienten wandern, an ihren isoelektrischen Punkten nicht mehr weiterwandern und ausfallen.

a) Zelluloseacetatelektrophorese

Abbildung 12 zeigt, daß bei einem Präparat von geringer spezifischer Aktivität nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung ein breites Eiweißspektrum sichtbar war, das - vor allem nach Wanderung im alkalischen Milieu - zwei Gipfel erkennen läßt. Mit steigender spezifischer Aktivität hob sich der schneller wandernde Gipfel immer stärker heraus, während der an-

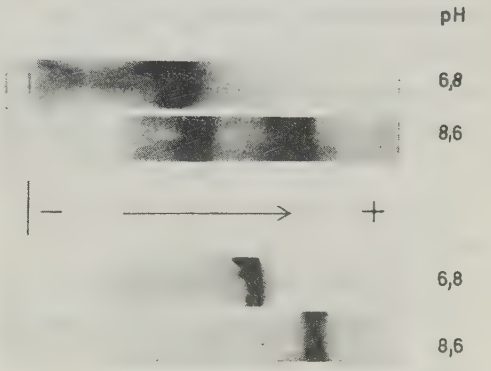

Abb. 12
Zelluloseacetat-elektrophorese zweier Prothrombinpräparate unterschiedlicher Reinheit bei pH 6,8 und pH 8,6

dere Gipfel und der über der ganzen Wanderungsstrecke dargestellte Eiweißschleier sich immer mehr verlieren. Bei dem Präparat mit der spezifischen Aktivität von 44 347 E/mg Tyrosin läßt sich schließlich nur noch eine einzige, scharfe Bande nachweisen. Wie aus der Abbildung ersichtlich, beeinflußte bei derart hochgereinigten Präparaten der pH-Wert der Pufferlösung, in der die Elektrophorese erfolgte, das resultierende Elektrophoresebild nicht nennenswert.

b) Elektrofokussierungsverfahren (flüssiges System)

Das Elektrofokussierungsverfahren ist eine noch relativ junge Methode, deren Leistungsfähigkeit bezüglich der Auftrennung von Proteinen selbst der Diskelektrophorese überlegen ist. Verschiedene bisher als einheitlich betrachtete Fraktionen von Myoglobin (60), Laktoperoxidase (6) und Cytochrom C (11)

konnten durch Anwendung der Dichtegradientenelektrophorese in mehrere Einzelkomponenten zerlegt werden.

Wie die Abbildungen 13 und 14 erkennen lassen, erfolgte nach der Aufbringung großer Prothrombinmengen keine deutliche Auftrennung in mehrere Fraktionen. Wurden jedoch geringste Mengen aktiven Materials verwendet, so ließ die photoelektrische Aufzeichnung der Extinktion beim Entleeren der Säule, wie das Kurvenbild (Abb. 15) zeigt, eine genauere Differenzierung zu. Man fand bei diesem Verfahren bei Präparaten mit niedriger spezifischer Aktivität zwei Gipfel, einer im Bereich von pH 4,25, ein anderer bei pH 5,6. Mit steigender spezifischer Aktivität wurde jedoch der bei pH 5,6 gelegene Gipfel immer kleiner. Da sich die Höhe dieses Gipfels bei Präparaten mit einer spezifischen Aktivität von über 30 000 E/mg Tyrosin nicht mehr erkennbar veränderte, scheint seinem Auftreten keine wesentliche Bedeutung für die Beurteilung von Reinheit und Einheitlichkeit eines Präparates beizumessen zu sein. Der Grund für sein Auftreten dürfte vielmehr darin liegen, daß während der Elektrofokussierung Alterationen an der Struktur des Prothrombin hervorgerufen werden, wodurch wegen der veränderten isoelektrischen Eigenschaften der entstehenden Produkte ein Ausfallen von Protein bei pH 5,6 verursacht wird. Eine gewisse Bestätigung findet diese Annahme dadurch, daß bei diesem Verfahren während eines Versuchsansatzes im Durchschnitt ein Verlust

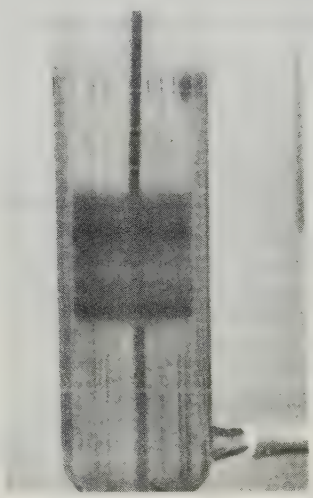

Abb. 13: Dichtegradientenelektrophorese; Proteinverteilung zu Versuchsbeginn

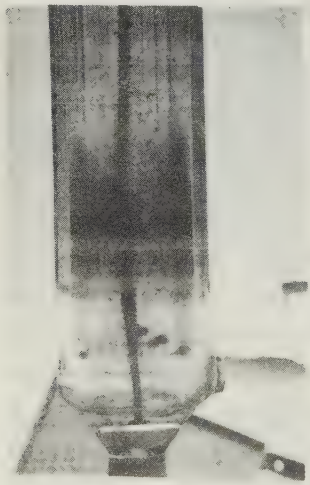

Abb. 14: Dichtegradientenelektrophorese; Proteinverteilung zu Versuchsende

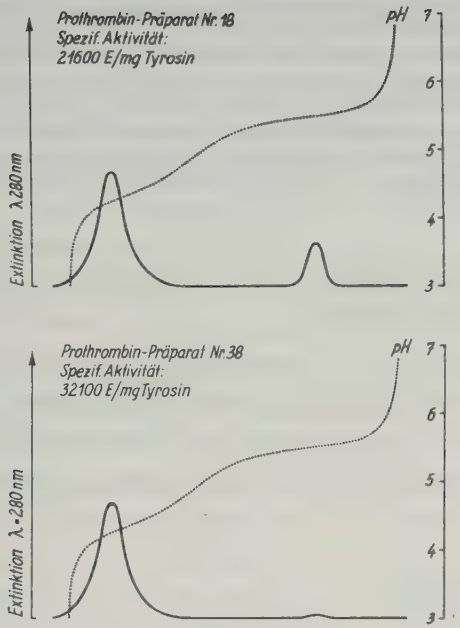

Abb. 15: Dichtegradientenelektrophorese; Extinktionskurven verschieden gereinigter Prothrombinpräparate.

von 75 bis 80 % der Aktivität des zu Beginn aufgebrachten Prothrombins zu beobachten war. Um herauszufinden, wodurch diese hohen Aktivitätsverluste bedingt waren, wurde untersucht, in welchem Maße die in der Säule verwendeten Materialien die Aktivität des Prothrombin beeinflussen.

Es wurden deshalb die im methodischen Teil (S. 25) angegebenen Lösungen hergestellt, die in ihrer Konzentration etwa der Zusammensetzung der Einzelsubstanzen in der Säule entsprachen. Die nach Inkubation gereinigten Prothrombins mit diesen Lösungen auftretenden Aktivitätsverluste sind aus der Abbildung 13 zu ersehen. Man erkennt, daß der relativ größte Aktivitätsverlust durch den Ampholyt (Lsg. 4) sowie das Natriumformiat (Lsg. 5) ver-

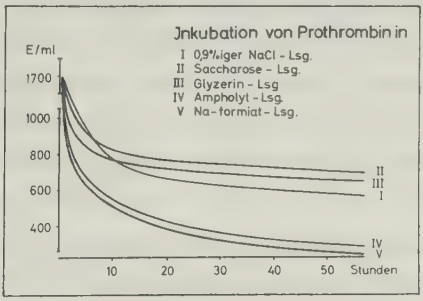

Abb. 16: Aktivitätsverlust von Prothrombin bei Inkubation in verschiedenen Lösungen bei 4°C (gelegentliches Aufschütteln) während 60 Stunden.

ursacht wird. Der Verlust tritt insbesondere während der ersten 20 Stunden auf. Im weiteren Verlauf wird er geringer. Beachtenswert scheint die Beobachtung, daß durch Ampholyt und Natriumformiat auch nach 50 Stunden die Aktivitätsminderung noch anhält. Saccharose (Lsg.2) und Glyzerin (Lsg.3) verursachen einen weit geringeren Verlust. Eine Verbesserung des Verfahrens scheint nur möglich, wenn es gelingt, einen Ampholyt zu finden, der die Aktivität des Prothrombin nicht beeinträchtigt. Erst dann nämlich, wenn das Prothrombin am Versuchsende unverändert wiedergewonnen werden kann, läßt das Elektrofokussierungsverfahren klare Rückschlüsse auf Einheitlichkeit und Reinheit der untersuchten Präparate zu.

C. Beobachtungen bei der Auftrennung von Prothrombin an DEAE-Cellulose

491 000 Einheiten Prothrombin mit einer spezifischen Aktivität von 32 791 E/mg Tyrosin wurden auf eine äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule aufgebracht. Nach dem Einsickern der Lösung wurde mit den Trispuffern A-G (S.27) sukzessiv eluiert. Die gewonnenen Proteinlösungen wurden auf gleiche Volumina eingeengt und ihr Gehalt an Prothrombin, Prethrombin, Thrombin,

Tabelle 7
Auftrennung von gereinigtem Prothrombin an DEAE-Cellulose unter Verwendung von Trispufferlösungen verschiedener Molarität und pH (Mischungsverhältnisse siehe Seite 27). Angabe des Gehalts von Prothrombin, Prethrombin und Autoprothrombin III in den einzelnen Fraktionen. Unter Rubrik Autoprothrombin III Angabe der Gerinnungszeit (GZ) als indirektes Maß für die Aktivität.

Trispuffer	Prothrombin E/ml	Prethrombin E/ml	Autopr. III GZ (sec)
A	231	330	19,8
B	54	98	53,4
C	61	220	63,0
D	85	123	43,2
E	74	108,5	23,4

Autoprothrombin C und Autoprothrombin III bestimmt. Thrombin und Autoprothrombin C waren in keiner Fraktion nachzuweisen. Die übrigen Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

Die Beurteilung der Werte beruht auf folgenden Überlegungen: Im Prethrombintest wird - methodisch bedingt - das in der Probe eventuell enthal-

tene Prothrombin mit erfaßt. Außerdem werden durch die Zugabe von Acceleratorglobulin und Autoprothrombin C zum Reaktionsgemisch die Gerinnungszeiten so verkürzt, daß Prothrombin im Prethrombintest um 30 - 40 % höhere Einheitenzahlen ergibt, als im normalen Prothrombintest. Es sprechen deshalb die Werte aus der Rubrik "Prethrombin (E/ml)" nur dann für einen tatsächlichen Gehalt an Prethrombin, wenn sie zumindest 40 % über dem zugehörigen Prothrombinwert liegen.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden in der Abbildung 17 die %-Werte, um die der ermittelte Prethrombinwert über dem des Prothrombin liegt, aufgetragen. Der Darstellung ist zu entnehmen, daß die Fraktion B nur einen geringen, die Fraktion C einen relativ großen Anteil an Prethrombin enthält.

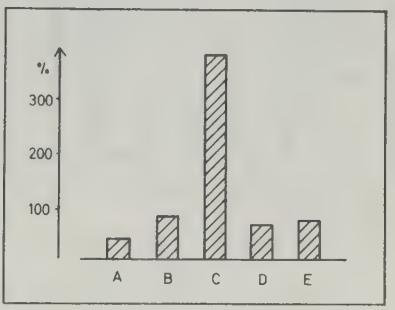

Abb. 17: Auftrennung von Prothrombin an DEAE-SH-Cellulose: Prethrombingehalt der einzelnen Fraktionen in % des Prothrombinwertes. Einzelheiten siehe Text.

Die im Autoprothrombin-III-Test ermittelten Gerinnungszeiten können nicht als direktes Maß für den tatsächlichen Gehalt an Autoprothrombin III gelten, da die bei ihrer Bestimmung gefundenen Gerinnungszeiten weitgehend vom Prothrombingehalt in der Probe abhängig sind. So ergab sich im Leertest mit physiologischer Kochsalzlösung eine Gerinnungszeit von 130,5 sec im Testsystem; bei Zugabe eines Prothrombinpräparates an Stelle der zu bestimmenden Lösung sank diese Zeit auf 8,9 sec ab. Da jedoch, wie aus Tabelle 7 hervorgeht, jede Fraktion einen unterschiedlichen Prothrombinanteil enthält, wurde zur Verdeutlichung der Autoprothrombin-III-Aktivität die in Abbildung 18 verwendete Darstellungsart gewählt: Die hellen Säulen geben den Prothrombingehalt der einzelnen Proben an. Die schraffierten Säulen stellen den nach Testung des Autoprothrombin III jeweils ermittelten Quotien-

ten aus Gerinnungszeit im Leeransatz und Gerinnungszeit im Testsystem - hier als Zeitverkürzungsfaktor bezeichnet - dar. Diese Abbildungsweise läßt erkennen, daß in den Fraktionen A, B, C und D der Zeitverkürzungsfaktor in Relation zum Prothrombingehalt der Proben steht, und daß lediglich bei Fraktion E ein hoher Zeitverkürzungsfaktor bei geringem Prothrombinanteil feststellbar ist, was für eine nicht unbeträchtliche Autoprothrombin III- Aktivität dieser Probe spricht.

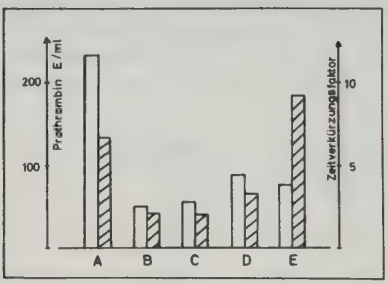

Abb.18: Auftrennung von Prothrombin an DEAE-SH-Cellulose: Gegenüberstellung Prothrombingehalt (hell) - Zeitverkürzung (schraffiert); Einzelheiten siehe Text.

Obwohl diese Ergebnisse keine quantitativen Aussagen erlauben, geht aus ihnen doch klar hervor, daß gereinigtes Prothrombin durch Adsorption an DEAE-Cellulose und nachfolgende Elution zum Teil in Prethrombin und Autoprothrombin III umgewandelt wird.

D. Prüfung der biologischen Wirkung der aus Prothrombin gewonnenen Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III

Ein nach dem SEEGERschen Originalverfahren gereinigtes Prothrombin vermag nach intravenöser Applikation bei Hunden einen durch orale Zufuhr von Hydroxy-Cumarinen bewirkten Prothrombinmangel zu ersetzen (41). Dieser Befund gab Anlaß zur Überprüfung der substituierenden Wirkung des nach dem beschriebenen modifizierten Verfahren gewonnenen Prothrombins im Tierexperiment; er wies darüber hinaus auf die Möglichkeit, die nach der Theorie von SEEGERS (siehe S.3) zu fordernden biologischen Effekte der aus diesem Präparat gewonnenen Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III zu untersuchen. Als Kriterien für die biologische Wirksamkeit der genannten

Substanzen dienten 1. ihr substituierender Effekt auf das in vitro getestete Gerinnungspotential des Blutes, und 2. ihre indirekte normalisierende Wirkung auf die intravitalmikroskopisch zu beobachtende Permeabilität und Resistenz der Kapillarwand im Bereich der mesenterialen Endstrombahn. Das zuletzt genannte Kriterium ist insofern besonders aussagekräftig, als hierdurch eventuelle biologisch irrelevante, eine Restitution des Gerinnungspotentials nur vortäuschende In-vitro-Effekte ausgeschlossen werden können[1].

Demgemäß war zu untersuchen, wie sich eine künstlich erzeugte extreme Verminderung der Prothrombinkonzentration des strömenden Blutes auf Kapillarpermeabilität und Kapillarresistenz - als zweier voneinander zu trennender Eigenschaften der Kapillarwand - auswirkt, und inwieweit die so möglicherweise hervorgerufenen Störungen der Kapillarwandschrankenfunktion durch intravenöse Zufuhr von gereinigtem Prothrombin bzw. den Zymogenen Prethrombin und Autoprothrombin III zu beheben sein würden.

Aufbereitung von Thrombin und Autoprothrombin C

Die Herstellung der zu den Versuchen benötigten Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III erforderte die vorherige Aufbereitung von Thrombin aus Prothrombin (s.S. 16). Bei dem hierfür angegebenen Verfahren (48),

---

1) Hinsichtlich der gegenwärtigen Vorstellungen über die Mechanismen, welche den Wechselbeziehungen zwischen dem Gerinnungspotential des Blutes und der Gefäßwandschrankenfunktion zugrunde liegen, sei auf einschlägige Darstellungen (8, 15, 40, 64) verwiesen. Die hier in Rede stehenden Hypothesen gehen sämtlich von der Annahme aus, daß in der mehr oder weniger unbeweglichen äußeren Plasmazone der strömenden Blutsäule fibrinoplastische und fibrinolytische Prozesse unterhalten werden, die zu permanenter Ablagerung (bzw. Wiederauflösung) von fibrinähnlichem Material an der inneren Oberfläche des Endothels sowie auch innerhalb der Gefäßwand selbst führen und so an der Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität der Gefäßwandschranke beteiligt sind. Eine Herabsetzung der "latenten intravasalen Gerinnung" führt zu einer vermehrten, eine Steigerung zu einer verminderten Durchlässigkeit der Gefäßwandschranke.

das außer Thrombin auch Autoprothrombin C liefert, wird die Beseitigung der beim Aussalzen der Proteinlösung im Anschluß an die säulenchromatographische Trennung in hoher Konzentration anfallenden Ammoniumionen durch wiederholte Acetonfällungen erreicht. Die relativ hohen Aktivitätsverluste, die mit diesem Vorgehen verbunden sind, konnten dadurch wesentlich verringert werden, daß an Stelle der Acetonfällungen eine mehrstündige Dialyse gegen auf 0^{o}C vorgekühltes Aqua dest. eingeführt wurde.

Ein Vergleich der in je zwei Versuchen erzielten Ausbeuten (Tab. 8) zeigt, daß durch die ersatzweise Verwendung der Dialyse ein wesentlich höherer Anteil von aktivem Material zurückgewonnen werden konnte.

Tabelle 8
Aufbereitung von Thrombin und Autoprothrombin C. Gegenüberstellung der Ergebnisse je zweier Versuche, bei denen nach der säulenchromatographischen Auftrennung die Einengung des aktiven Materials einmal durch Acetonfällungen, zum anderen durch Dialyse erfolgte.

	Acetonfällungen		Dialyse	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Prothrombin (E ges.) im Versuchsansatz	105 000	73 800	190 000	311 780
gewonnenes Thrombin (E ges.)	40 000	23 500	121 600	230 000
Thrombin (E in % der Ausgangsmenge Prothr.)	38,1	32,2	64,0	73,7
gewonnenes Auto-C (E ges.)	7 500	17 000	58 000	90 200

Die Herstellung der beiden Enzyme erbrachte zugleich den Nachweis, daß die nach dem modifizierten Isolierungsverfahren gewonnenen hochgereinigten Prothrombinpräparate auch bezüglich ihrer Überführbarkeit in Thrombin und Autoprothrombin C den bisher zu diesen Umwandlungsreaktionen verwendeten weniger gereinigten Präparaten zumindest gleichwertig sind.

Aufbereitung der Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III

Da das Ausgangsreaktionsgemisch für die Gewinnung von Prethrombin und Autoprothrombin III einen relativ hohen Thrombinanteil aufwies, mußte ein Celluloseionenaustauscher gefunden werden, der dieses Gemisch sauber in seine Komponenten (Thrombin, Prethrombin, Autoprothrombin III) aufzutrennen vermag. Das zur Herstellung von Thrombin und Autoprothrombin C bewährte "DEAE-GS" erwies sich hierfür als wenig brauchbar. Zufriedenstellend verlief die Trennung dagegen bei Verwendung von DEAE-SH-Cellulose (Tab. 9).

Tabelle 9

Aufbereitung von Prethrombin und Autoprothrombin III. Gegenüberstellung der Ergebnisse je zweier Versuche, bei denen die säulenchromatographische Auftrennung einmal mit dem Cellulose-Ionenaustauscher DEAE-GS, zum andern mit DEAE-SH ausgeführt wurde. Zu beachten ist der geringe Thrombinanteil im ml Prethrombinlösung nach Verwendung von DEAE-SH.

	DEAE-GS		DEAE-SH	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Prothrombin (E ges.) im Versuchsansatz	106 000	300 000	620 000	450 000
Thrombin (E ges.) im Versuchsansatz	10 000	19 200	36 000	32 000
gewonnenes Prethrombin (E ges.)	2 400	51 600	150 325	92 000
Thrombingehalt (E) im ml Prethrombinlösg.	46	850	3	8

Wie aus der untersten Rubrik der Tabelle zu ersehen ist, konnten nach der Auftrennung an Cellulose vom Typ DEAE-SH pro ml Prethrombinlösung nur noch 3 bzw. 8 Einheiten Thrombin nachgewiesen werden. Da aber auch ein so niedriger Thrombingehalt der Lösung für deren Verwendung im Tierversuch noch zu hoch erschien, wurden je 2,5 ml Prethrombinlösung mit je 0,5 ml Kaninchenzitratplasma inkubiert (10 - 15 min). Durch das im Plasma enthaltene Antithrombin wurde der Thrombingehalt der Lösung weiter ernie-

drigt, so daß die Versuchstiere pro Injektion insgesamt höchstens 1 - 2 Einheiten Thrombin erhielten, eine Menge, die bei Berücksichtigung der starken Verdünnung im Blut der Versuchstiere sowie der zeitlich protrahierten Injektion ohne Bedenken in Kauf genommen werden konnte.

Ergebnisse der Tierversuche

Zur Verminderung des Prothrombingehaltes im Kaninchenblut diente Marcumar. Abbildung 19 zeigt, wie nach oraler Gabe von 6 mg Marcumar pro kg Körpergewicht des Versuchstieres der Prothrombinspiegel innerhalb vierzig Stunden stark abfiel, während zugleich Gerinnungs- und Blutungszeit anstiegen. Nach Substitution des Prothrombinpotentials trat eine Normalisierung dieser Zeiten ein.

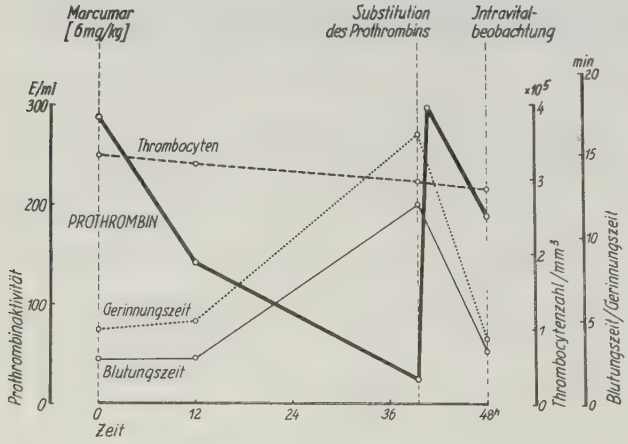

Abb.19
Gerinnungsverhältnisse nach Marcumargabe u. späterer Substitution des so bewirkten Prothrombindefizits. Die hellgrau gezeichneten Linien im rechten Abschnitt des Diagramms beziehen sich auf die bei Kontrolltieren (keine Prothrombin-Substitution) gefundenen Werte.

Über die Durchlässigkeitsverhältnisse an der jejunalen Endstrombahn geben die Abbildungen 20 und 21 Auskunft. Sie wurden neben anderen Aufnahmen erstmals bei der 5. Europäischen Konferenz für Mikrozirkulation 1968 in Göteborg gezeigt (40). Die Abbildung 20 zeigt das Gefäßbild unter normalen, unbeeinflußten Verhältnissen, während Abbildung 21 den Zustand maximaler Hypoprothrombinämie (48 Stunden nach Applikation des Markumars) darstellt.

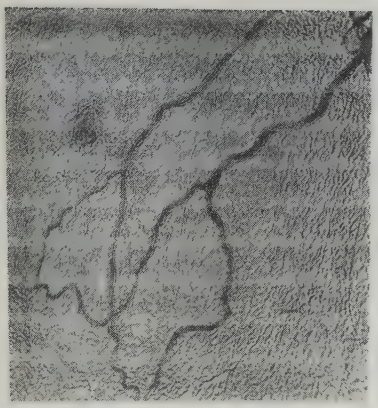

Abb.20: Bild der jejunalen Endstrombahn (arterielle und venöse Seite) des Kaninchens unter normalen, unbeeinflußten Blutverhältnissen (40).

Weitere Aufnahmen, welche die Gefäßverhältnisse 8 Stunden nach Substitution des durch Markumar gesenkten Thrombinpotentials durch Prethrombin, und solche, welche die Verhältnisse 8 Stunden nach Substitution des Markumar-bedingten Prothrombinmangels im Blut durch Prethrombin und Autoprothrombin III zeigen, sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sollen an dieser Stelle nicht veröffentlicht werden, da sie im Rahmen einer umfassenderen Darstellung der Probleme der Gefäßwandschrankenfunktion vorgestellt werden sollen.

Im Rahmen dieser Arbeit scheint es jedoch von Wichtigkeit, eine Gegenüberstellung des normalen Gefäßbildes mit dem Bild durchzuführen, das bei auf 5 % der Norm abgesenktem Prothrombinspiegel vorgefunden wird. So zeichnet sich das normale Gefäßbild durch folgende Gegebenheiten aus: 1.) Es fehlen zelluläre Extravasate. 2.) Frühestens drei Minuten nach Farbstoffinjektion zeigt sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild erste perivasale Fluoreszenz, und zwar ausschließlich im venösen Kapillarbettabschnitt. 3.) Die Ausbreitung der perivasalen Fluoreszenz erfolgt nur langsam bei Erkennbarbleiben der typischen Gewebestruktur.

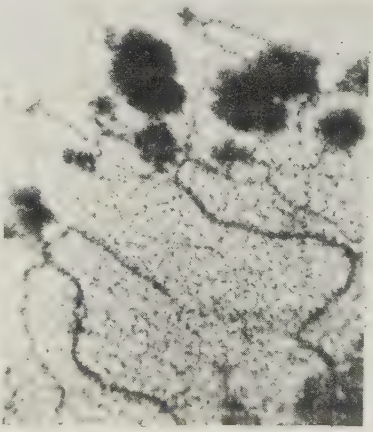

Abb.21: Bild der jejunalen Endstrombahn des Kaninchens bei auf 5 % der Norm durch Markumar abgesenktem Prothrombinspiegel. Beachte die zellulären Extravasate und Kugelblutungen (40)!

Diese drei Punkte waren nun die Kriterien für die Bewertung der substituierenden Wirkung von Prethrombin und Prethrombin + Autoprothrombin III. Dabei zeigte sich, daß Substitution des Thrombinpotentials mit Prethrombin allein ein Bild wie bei reinem Prothrombinmangelzustand ergab, während nach Gabe beider Prothrombinderivate, also Prethrombin und Autoprothrombin III, kein Unterschied gegenüber dem normalen Gefäßbild feststellbar wurde.

Tabelle 10 gibt die wichtigsten Versuchsdaten von je zwei vergleichbaren Versuchen wieder. In ihr sind auch die sich aus dem jeweiligen Gefäßbild

Tabelle 10

Protokollierung der Ergebnisse der Tierversuche (Beobachtung des Gefäßbildes der jejunalen Endstrombahn 8 Stunden nach iv-Gabe von Prethrombin bzw. Prethrombin und Autoprothrombin III als Substituenten des durch Marcumar erniedrigten Thrombinpotentials im Blut von Kaninchen). Rubrik I zeigt die Verhältnisse nach Gabe von 18 500 E, Rubrik II nach Applikation von 50 000 E Prethrombin. Unter Rubrik III (Gabe von 32 000 E Prethrombin + 2,0 ml Autoprothrombin III) und IV (Gabe von 20 000 E Prethrombin und 2,5 ml Autoprothrombin III - Lösung) sind die Ergebnisse nach kombinierter Gabe von Prethrombin und Autoprothrombin III dargestellt.

	I	II	III	IV
Prothrombineinheiten je ml Blut d. Versuchstiere z.Z. der Gefäßbeobachtung	29	40	75,0	122,0
Prethrombineinheiten je ml Blut d. Versuchstiere z.Z. der Gefäßbeobachtung	107	110	97,5	135,0
Auftreten erhöhter transmuraler Farbstoffpassage	+++	+++	---	---
Auftreten zellulärer Extravasate (Kugelblutungen)	+++	+++	---	---
Erstes Auftreten perivaskulärer Fluoreszenz (sec)	3-6	3-6	ca.240	ca.210

ergebenden Befunde hinsichtlich Diffusion des Farbstoffes, Extravasatbildung und Ausbreitungsgeschwindigkeit der perivaskulären Fluoreszenz verzeichnet.

Auf ein bisher nicht erklärbares Phänomen, das aus den stark umrandeten Werten der Tabelle 10 hervorgeht, sei besonders hingewiesen. Es besteht darin, daß sich die getrennt verabfolgten Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III nach mehrstündiger Kreislaufpassage wieder als "Prothrombin" im Prothrombintest nachweisen lassen, was bei Mischung von Prethrombin und Autoprethrombin III in vitro nicht gelingt. Die Möglichkeit einer in vivo erfolgenden Komplexbildung als Voraussetzung für eine "reziproke Zymogenaktivierung" scheint in diesem Zusammenhang diskutierbar.

IV. Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Methodik zur Herstellung von hochgereinigten Prothrombinpräparaten nach SEEGERS (42, 43) mit Hilfe der Ammoniumsulfatfällung hat sich hinsichtlich des Reinheitsgrades, ausgedrückt als spezifische Aktivität (= Einheiten/mg Tyrosin der vorliegenden Proteinlösung) als sehr brauchbar erwiesen. Auch das geänderte Verfahren, bei dem an die Stelle der Ammoniumsulfatfällung die Einstellung der desorbierten Lösung auf pH 6,4 und anschließende Dialyse gegen Aqua dest. tritt, konnte diese bewährte Methode nicht ersetzen, sie war nicht einmal in der Lage, ähnlich gute Ergebnisse zu liefern. Daher bot es sich an, eine weitere Steigerung der Präparatequalität auf dem Weg über eine Weiterentwicklung des schon bewährten Verfahrens zu versuchen.

Die im Durchschnitt beim SEEGERschen Verfahren erzielten spezifischen Aktivitäten lagen bisher in einem Bereich von 24 000 bis 28 000 E/mg Tyrosin, besonders gute Präparate erreichten bis zu 32 000 E/mg Tyrosin. Erst durch weitere Reinigung an Sephadex (31), Amberlite IRC 50 (36) oder DEAE (50) gelang es, noch vorhandene Verunreinigungen weitgehend zu entfernen und so Präparate mit einem höchsten Reinheitsgrad bis zu 40 000 E/mg Tyrosin herzustellen. Diese chromatographierten Präparate wiesen jedoch zum Teil meßbare chemische, funktionelle und morphologische (elektronenoptisch erkennbare) Veränderungen gegenüber nicht chromatographiertem Prothrombin auf (38). Folglich mußte es das Ziel in der Aufbereitung von Prothrombin sein, ein Präparat ähnlich hoher spezifischer Aktivität ohne Verwendung chromatographischer Methoden herzustellen, um von vornherein Strukturänderungen auszuschließen.Wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte, gelang dies auch, denn die erzielten spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 31 500 und 44 500 E/mg Tyrosin, übertrafen also sogar noch die bisher nur durch zusätzliche Reinigungsschritte erreichbaren spezifischen Aktivitäten.

Auf welche Änderungen in der Methodik der Reindarstellung ist nun diese Steigerung der spezifischen Aktivität zurückzuführen? Von Bedeutung erschien einmal, daß versucht wurde, während des gesamten Versuchsablaufes in der Prothrombinlösung eine Temperatur von 0^{o} - 2^{o}C aufrechtzuerhalten, um einen Aktivitätsverlust im Laufe des Isolierungsverfahrens, der auf überhöhte Temperaturen zurückzuführen gewesen wäre, zu vermeiden.

Eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivität durch Verringerung des Aktivitätsverlustes bringt die Verkürzung der zur Versuchsdurchführung benötigten Zeit. Sie lag zunächst bei etwa 35 Stunden, konnte jedoch dann auf 20 - 22 Stunden abgekürzt werden. Die relativ lange Sedimentationszeit zu Versuchsbeginn zeigte auf Grund der konsequent durchgeführten Kühlung wenig Einfluß auf die spezifische Aktivität der Endprodukte, erlangte aber eine gewisse Bedeutung im Hinblick auf die quantitative Ausbeute.

Von weniger Gewicht scheint die Tatsache, daß die Anfangsfällung bei pH 5,05 - 5,1, und nicht, wie in der Originalarbeit angegeben, bei pH 5,1 - 5,2 ausgeführt wurde. Auch erwies sich das Unterlassen der Waschung des nach der Sedimentation erhaltenen Niederschlages nicht als Nachteil.

Unumgänglich ist dagegen ein gründliches Homogenisieren dieser Suspension bei 40^{o}C im Rahmen der isoelektrischen Fällung bei pH 7,0 mit anschließendem hochtourigen Zentrifugieren (6 000 U/min, 0^{o}C, 30 Minuten).

Die verwendete Menge $Mg(OH)_2$-Paste entsprach der von SEEGERS gemachten Angabe, die Desorptionszeit dagegen wurde verlängert. Als günstig erwies es sich, die $MgCO_3$-Kristalle nicht entsprechend der Originalangabe durch Filtration durch mehrere Lagen Mull zu entfernen, nachdem die Lösung über Nacht stehen gelassen war, sondern durch Entschäumen der Lösung mittels Zugabe von einem Tropfen Tri-n-butyl-phosphat und anschließendes sofortiges Zentrifugieren (20 Minuten bei 6 000 U/min, 0^{o}C). Der Überstand konnte dann sogleich mit Ammoniumsulfat gefällt werden. Die von SEEGERS beschriebene Erscheinung, daß nach der zweiten

Ammoniumsulfatfällung ein erneuter Niederschlag von $MgCO_3$ auftritt, der dann durch Dekantieren entfernt werden müsste, trat im Verlauf dieser Versuche nur ganz vereinzelt auf. Regelmäßig waren dann auch die Ergebnisse schlechter als bei vergleichbaren Isolierungen ohne Auftreten dieses Niederschlages. Eine Begründung für das Auftreten bzw. Ausbleiben dieses Auskristallisierens konnte nicht gefunden werden, ihr seltenes Vorkommen mag aber in der geänderten Versuchsdurchführung begründet sein.

Bei der abschließenden Dialyse soll nach SEEGERS ein spezifischer Widerstand von zumindest 1 800 Ohm · cm in der Proteinlösung erreicht werden. Dieser Wert erscheint nach den von uns gemachten Erfahrungen zu niedrig, denn die besten Ergebnisse wurden bei einem spezifischen Widerstand von 6 000 - 10 000 Ohm · cm erreicht.

Die Schlußfällung des aktiven Materials sollte nicht in einem einzigen Schritt zwischen pH 5,4 und 3,9 erfolgen. Als besonders wesentlich für die Güte der Endpräparate erwiesen sich nämlich Beobachtungen an Versuchsansätzen, wo bei dieser isoelektrischen Trennung die Verteilung des Eiweißes über den genannten pH-Bereich durch fraktionierte Ausfällung bestimmt wurde. So ließ sich zeigen (siehe Abb. 11 auf Seite 36), daß sich das Prothrombin nicht über den gesamten Fällungsbereich gleichmäßig verteilt, sondern daß ein deutliches Maximum der Ausfällbarkeit besteht. Hierzu parallel läuft die spezifische Aktivität innerhalb der einzelnen Fraktionen. Daraus ist zu schließen, daß einmal im Bereich des Maximums der Ausfällbarkeit das aktive Material mit der höchsten spezifischen Aktivität zu gewinnen ist, zum andern, daß über den gesamten Fällungsbereich ein relativ geringer, offenbar weitgehend gleichmäßiger Anteil von inaktivem Protein vorliegt. Es empfiehlt sich deshalb, die Fraktionen von pH 3,9 - 4,6 und 4,95 - 5,4 zusammenzufügen und gegebenenfalls mit chromatographischen Verfahren weiter zu reinigen, und als eigentliches Endpräparat das Material zu verwenden, das im Bereich von pH 4,6 - 4,95 ausfällt. Die spezifische Aktivität liegt bei einem solchen Präparat dann im allgemeinen über 32 500 E/mg Tyrosin.

Will man höchstgereinigtes Prothrombin gewinnen, so muß man selbst im pH-Bereich von 4,6 - 4,95 noch in pH-Schritte von etwa 0,1 auftrennen und durch Testung die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität bestimmen, die dann für die weiteren Untersuchungen zu verwenden ist.

Als bemerkenswerter Befund im Rahmen dieser Aufschlüsselung des aktiven Materials über einen weiten pH-Bereich scheint auch, daß beim Prothrombin eine Differenz zwischen Maximum der Ausfällbarkeit und isoelektrischem Punkt besteht. Beide Werte hängen nicht unwesentlich von der Ionenstärke der Lösung ab, in der sie bestimmt werden. So konnte gezeigt werden (siehe S. 40), daß sich das Maximum der Ausfällbarkeit mit steigendem spezifischem Widerstand, also abnehmender Ionenstärke, von pH 4,75 nach pH 4,95 verschiebt. Auch der isoelektrische Punkt schwankt je nach Ionenstärke der Lösung, in der er bestimmt wird, um etwa eine pH-Stufe (49). Für eine Ionenstärke von 0,2 wird er mit pH 4,25 angegeben (54), mit pH 4,2 bei Ionenstärke 0,1 (21). Bei den mit dem Elektrofokussierungsverfahren angestellten Versuchen konnte ein Isoelektrischer Punkt von pH 4,25 verifiziert werden, allerdings ist hinsichtlich der Ionenstärke der Ampholytlösung keine Angabe möglich, da deren Ionenstärke nicht bekannt ist (61); die Abweichung des isoelektrischen Punktes mit pH 4,2 - 4,25 vom Maximum der Ausfällbarkeit mit pH 4,75 - 4,95 ist jedoch durch diese Untersuchung weiter verdeutlicht.

Das ursprüngliche Verfahren zur Prothrombinisolierung, das der soeben diskutierten Methode zu Grunde liegt, ist annähernd 30 Jahre alt (42). Während dieser Zeit wurden immer wieder Stimmen laut, die die Reinheit und Einheitlichkeit dieser Präparate - zunächst wohl noch mit Recht - bezweifelten (1, 24). Mit der Weiterentwicklung der Methodik konnten jedoch immer höher gereinigte Präparate hergestellt und ein Großteil der Kriterien erfüllt werden, die zum Nachweis der Einheitlichkeit nötig sind. So konnte gezeigt werden, daß hochgereinigtes Prothrombin, das spezifische Aktivitäten bis nahe 40 000 E/mg Tyrosin besitzt,

1.) eine Komponente in der Ultrazentrifuge bildet (21),
2.) gleiche Teilchengröße bei Messungen mit dem Elektronenmikroskop zeigt (38),
3.) bei Verwendung immunologischer Techniken eine einzige Komponente aufweist (1, 4),
4.) die Aminosäurezusammensetzung bei Bestimmung durch zwei unabhängig voneinander arbeitenden Laboratorien übereinstimmte (20, 28, 29),
5.) als endständige Aminosäure Alanin in verschiedenen Laboratorien gefunden wurde (20, 28, 29, 59),
6.) bei der Elektrophorese eine einzige Bande im sauren Bereich bis pH 6, 9 nachgewiesen werden konnte (49).

Für die nach der beschriebenen, modifizierenden Technik hergestellten Präparate, die spezifische Aktivitäten bis zu 44 500 E/mg Tyrosin erreichten, kann angenommen werden, daß auch sie die oben angeführten Eigenschaften besitzen.

Der Befund, daß Prothrombin bei der Elektrophorese im saueren Bereich einheitlich, im Alkalischen jedoch in zwei Komponenten wandert, hat bisher die meisten Zweifel an der Einheitlichkeit der Präparate aufkommen lassen. SEEGERS selbst deutete diese Erscheinung als Dissoziation des Moleküls im alkalischen Bereich (49).

Diese Deutung läßt sich jedoch nicht mehr aufrecht erhalten. Die damals durchgeführten Untersuchungen erfolgten nämlich mit Präparaten, deren höchste spezifische Aktivität bei etwa 35 000 E/mg Tyrosin lagen (1, 29). Bei Elektrophoresen mit den oben beschriebenen höchstgereinigten Präparaten, deren spezifische Aktivitäten noch um fast 10 000 Einheiten/mg Tyrosin höher lagen, ließ sich jedoch, wie die Abbildung 12 auf S. 38 zeigt, auch im Alkalischen kein zweiter Gipfel nachweisen. Das bedeutet, daß der zweite Gipfel und der manchmal auftretende Eiweißschleier bei früheren Präparaten durch Verunreinigungen verursacht war.

Als weiteres Kriterium für die Einheitlichkeit der gewonnenen Prothrombinpräparate sollten als neue Methode Untersuchungen mit dem Elektrofokussierungsverfahren dienen. Wie im Ergebnisteil festgestellt werden mußte, scheint dieses Verfahren jedoch keine bindenden Aussagen gegen oder für die Theorie der Einheitlichkeit des Prothrombin zu erlauben, da im Versuchsverlauf die Aktivität des Materials weitgehend verloren geht, und somit nur mehr Proteine, die wohl Bruchstücke des ursprünglichen Prothrombin oder Prethrombin mit inaktiven Wirkzentren darstellen, nachgewiesen werden können.

Die Feststellung zweier C-terminaler Endgruppen bei Prothrombinpräparaten führte zu dem Einwand, die untersuchten Präparate wären uneinheitlich. Von einheitlichem Material könne man allenfalls dann sprechen, wenn das Prothrombin nachweislich aus zwei Ketten aufgebaut sei (23). Mit von uns zur Verfügung gestellten höchstgereinigten Präparaten wurde nun am hiesigen Biochemischen Institut dieser Nachweis angestellt. Darüber wird Herr Eduard Wagner - dem ich für die Überlassung der bisher vorliegenden Ergebnisse zu danken habe - in einer ausführlichen Arbeit noch berichten.

In aller Kürze seien diese Untersuchungen geschildert: Durch Inkubation in einer Harnstofflösung wurden die Schwefelbrücken im Prothrombin aufgebrochen und das so erhaltene Material mit Hilfe der Disk-Elektrophorese getrennt. Es traten dann zwei Banden auf, was für eine doppelkettige Struktur des Prothrombin spricht. Entsprechende Ansätze mit Thrombin und Autoprothrombin C zeigten nur jeweils eine Bande, so daß man eine Auftrennung der beiden Ketten bei der Aktivierung des Prothrombin in Thrombin und Autoprothrombin C annehmen darf.

Bei Kontrollversuchen mit nicht in Harnstoff inkubiertem Prothrombin ließ sich in der Disk-Elektrophorese ebenfalls nur eine Bande nachweisen, was für die Einheitlichkeit des untersuchten Materials spricht.

Es sei noch vermerkt, daß der Kontrollversuch mit nicht vorbehandeltem Prothrombin auch in der Disk-Elektrophorese nur eine Bande zeigte, wodurch die Theorie von der Einheitlichkeit des Prothrombin weiter gestützt wird.

Die Tatsache, daß das Prothrombin mit größter Wahrscheinlichkeit als einheitlich betrachtet werden kann, sagt noch nichts über seine chemische Struktur aus. Wie gezeigt werden konnte (32, 54), handelt es sich beim Prothrombin um ein Protein, das in verschiedenste Unterbestandteile zer-

legt werden kann, die zum Teil wieder enzymatische Wirkung besitzen, zum Teil inaktiv sind. Diese geordnete, in der Betrachtung des Systems der Blutgerinnung als zielgerichtet erscheinende "Aufspaltung" läßt Zweifel daran aufkommen, daß es sich beim Prothrombin um ein Molekül im klassischen Sinn als "Gebilde höherer Ordnung, in dem die Gesamtheit der Atome durch Atombindungen zusammengehalten wird" (17a) handelt. Eher ist anzunehmen, daß es sich hier um einen Komplex aus wahrscheinlich zwei Polypeptidketten handelt, der in einer Funktionseinheit die Quartärstruktur (5) des fraglichen Proteins bildet (62). Wenn auch eine Deutung der Komplexbindung im Sinne einer gesonderten Bindungsart mit Nebenvalenzen heute abgelehnt wird - man nimmt vielmehr eine völlige Gleichwertigkeit aller vom Zentralatom ausgehenden Bindungen an -, so wird doch an einer erhöhten Abspaltungsbereitschaft der Substituenten nicht gezweifelt (17b). Diese erhöhte Abspaltungsbereitschaft wird demnach zu einem Kriterium für die Diskussion um Molekülform oder Komplexnatur des Prothrombin.

Von einer solchen hohen Abspaltbarkeit kann man sprechen, wenn es gelingt, einen Komplex durch Anwendung einfachster physikalisch-chemischer Methoden aufzutrennen, wobei insbesondere eine Ausschaltung enzymatischer Prozesse zu erfolgen hat. Für diese Abspaltungsbereitschaft sprachen bisher Veränderungen am Prothrombin, die bei der Chromatographie der nach der SEEGER'schen Methode hergestellten Präparate erfolgte. Sie waren gering, bewirkten aber bereits Änderungen in der Reaktionsbereitschaft der so aufbereiteten Präparate (28).

Einen weiteren Hinweis auf die gesteigerte Reaktionsbereitschaft bietet das Elektrofokussierungsverfahren. Wie aus den Abbildungen auf Seite 40 (Abb.15) entnommen werden kann, verursacht das Einwirken von Ampholyt und Strom auf das Protein eine Spaltung, die sich darin äußert, daß Präparate, die im Bereich von pH 5,15 - 4,5 gefällt wurden, am Ende der Elektrofokussierung einen weiteren, wenn auch kleinen Gipfel im Bereich von pH 5,4 aufwiesen, daß also ein Spaltprodukt mit veränderten isoelektri-

schen Eigenschaften entstanden war.

Die größte Aussagekraft hinsichtlich der Deutung des Prothrombin als Komplex zeigten indessen Versuche, bei denen Prothrombin an DEAE chromatographiert wurde (27). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß durch die einfache Anlagerung an Cellulose und anschließende Ausschwemmung in bestimmten Fraktionen des Eluates Prethrombin- und Autoprothrombin-III-Aktivität entstanden war. Bei Kontrollversuchen, bei denen absichtlich DEAE mit niedriger Kapazität verwendet wurde, was eine besonders geringe Beeinflussung des aktiven Materials versprach (dadurch mußte in Kauf genommen werden, daß sich in allen Fraktionen noch Prothrombin nachweisen ließ, was in der Beurteilung der Versuchswerte zu berücksichtigen war) und in dem an Stelle von Phosphatpuffer der Ionenstärke 0,1 Trispuffer mit steigender Molarität und wechselndem pH zum Auswaschen diente, konnte dieser Befund bestätigt werden.

Bei den Überlegungen hinsichtlich Einheitlichkeit und Struktur des Prothrombin müssen auch die möglichen Reaktionsweisen, die schließlich zur Thrombinbildung bzw. zur Gerinnung führen, berücksichtigt werden. SEEGERS hat ein Schema der Sequenz der Prothrombinaktivierung aufgestellt, in dem das Prothrombin an zentraler Stelle steht (siehe Abbildung 2, S.3). Die Grundüberlegungen sind experimentell untermauert. So lassen sich durch Zugabe von Thrombin zu Prothrombin (47), oder, wie gezeigt werden konnte, durch bloße Chromatographie an DEAE-Cellulose zwei Zymogene gewinnen, nämlich das Prethrombin und das Autoprothrombin III. Das Autoprothrombin III läßt sich in Autoprothrombin C überführen (48), welches seinerseits Prethrombin in Thrombin umsetzt (52).

Der Auffassung, daß dem Prothrombin die Schlüsselstellung im Gerinnungsablauf zukommt, steht, wie einleitend näher ausgeführt, die Meinung einer Gruppe von Autoren gegenüber, die den Ablauf der Blutgerinnung als eine wasserfallartige (9, 25) oder kaskadenförmige Folge enzymatischer Reaktionen betrachten, innerhalb derer das Prothrombin eine zwar wesentliche, aber doch anderen Plasmakomponenten gleichgeordnete Stellung einnimmt (siehe Abbildung 1, S.2).

Bei der Abwägung, welcher Theorie der Vorzug zu geben sei, können mehrere Befunde weiterhelfen. Man weiß, daß das Autoprothrombin III Faktor X-Aktivität (13, 14), das Autoprothrombin C Faktor Xa-Aktivität (32, 33, 46) besitzt. Nach Ansicht der Vertreter der Kaskadentheorie handelt es sich beim Faktor X um ein selbständiges Enzym. Das stets nachweisbare Auftreten von Faktor X-Aktivität in Prothrombinpräparaten, die nach der Methode von SEEGERS (43) hergestellt seien, spräche für die Kaskadentheorie; es sei ein Zeichen von Verunreinigungen im Prothrombinpräparat (55).

Dem kann aber entgegengehalten werden, daß sich aus gereinigtem Prothrombin - das durchaus einen geringen Anteil nachweisbarer Faktor X-Aktivität enthalten mag - noch quantitativ eine solche Faktor X-Aktivität gewinnen läßt, so daß also die geringe Faktor X-Aktivität in Prothrombinpräparaten als Produkt einer durch das Isolierungsverfahren bedingten Teilaktivierung zu betrachten ist.

Eher spricht der Befund, daß man aus Prothrombin quantitativ Autoprothrombin III, also Faktor X-Aktivität gewinnen kann, gegen die Kaskadentheorie, denn in ihr wird der Aktivierungsschritt von Faktor X zu Faktor Xa schon früher gefordert als die enzymatische Überführung von Prothrombin, dem das Autoprothrombin III ja offensichtlich entstammt, in Thrombin. Außerdem spricht gegen die Kaskadentheorie, daß in Faktor-X-Mangelplasma die Gabe von Autoprothrombin III und auch die Gabe von reinem Prothrombin diesen Mangelzustand beheben können (34).

Komplexnatur und zweikettiger Bau des Prothrombin lassen im Hinblick auf den Reaktionsablauf, der zur Blutgerinnung führt, weitere Schlüsse zu. Es fällt auf, daß sowohl im SEEGER'schen Schema wie auch bei der Kaskadentheorie die Entstehung von aktivem Faktor X, also Autoprothrombin C, einen der Schlüsselpunkte darstellt (9, 25, 46). Die in der Kaskadentheorie geforderten Faktoren XI, IX, VIII und VII sind als selbständige Faktoren im Sinne definierter Plasmaproteine umstritten (46), und - wie zuvor ausgeführt - wohl als dem Prothrombinkomplex immanente Wirkungsprinzipien zu verstehen, die dann bei der Fehlbildung des Prothrombinkomplexes im klinischen Bild als Faktorenmangel imponieren.

Die leichte Spaltbarkeit des Prothrombin bestätigt das SEEGER'sche Schema, das einen Zerfall in Prethrombin, Autoprothrombin III und einen Inhibitor fordert. Mit der zweikettigen Struktur läßt sich dies so in Einklang bringen, daß man annimmt, daß durch eine Trennung in die beiden Einzelketten und eine weitere Spaltung einer dieser beiden so entstandenen Ketten diese Reaktionsprodukte aus dem Prothrombinkomplex entstehen.

Der Vorgang, der zur Aktivierung des Faktor XII führt, kann bis heute noch nicht als eindeutig geklärt gelten und scheint, je nachdem, ob es sich um latente Gerinnung innerhalb des Gefäßsystems oder um die Gerinnung bei einer Gewebeblutung handelt, verschieden zu sein. Man trägt dem Rechnung, indem man einmal von Aktivierung im intrinsic system, und zum anderen im extrinsic system spricht.

Hinsichtlich des intrinsic systems (z.B. latente Gerinnung) läßt sich eine Deutung insoweit versuchen, als man annehmen kann, daß bei der physiologischen Alterung des Prothrombin in geringem Umfang ein statistischer Zerfall in Autoprothrombin III, Prethrombin und Inhibitor, über den man allerdings noch kaum Aussagen machen kann, stattfindet, es scheinen allerdings auch noch andere Aktivierungsmöglichkeiten gegeben, wie etwa die Aktivierung an Grenzflächen (39).

Beim extrinsic system liegt das Hauptgewicht wohl unzweifelhaft auf der Wirkung der Gewebethrombokinase, jedoch scheinen auch hier die Aktivierungsmöglichkeiten noch nicht endgültig abgeklärt zu sein. Aus dieser Unsicherheit heraus dürfte es gerechtfertigt sein, die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa - im SEEGER'schen Schema von Autoprothrombin III zu Autoprothrombin C - im Rahmen dieser Arbeit lediglich mit "intrinsic"- und "extrinsic activation" zu kennzeichnen.

Die weitere Aktivierung muß dann so gedeutet werden, daß der Faktor Xa Prethrombin in Thrombin überführt, das dann seinerseits die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin einleitet. Die Möglichkeit, bei in vitro -Versuchen Prothrombin durch Zugabe von Thrombin in Prethrombin, Autoprothrombin III und einen Inhibitor aufzuspalten, läßt eine Rückwirkung des Thrombin

auf das Prothrombin im Sinne der Auslösung eines autokatalytischen Prozesses als sehr wahrscheinlich erscheinen. Inwieweit der Inhibitor diesen Prozeß hemmt, und unter welchen Bedingungen dies geschieht, ist bisher noch ungeklärt. Auch die Frage, welche anderen Faktoren mitwirken, um eine lokalisiert ablaufende Gerinnung zu gewährleisten, bedarf noch weiterer Klärung. Trotzdem soll in Abbildung 22 ein Schema gezeigt werden, das den nach den zuvor geschilderten Versuchen und Überlegungen wahrscheinlichen

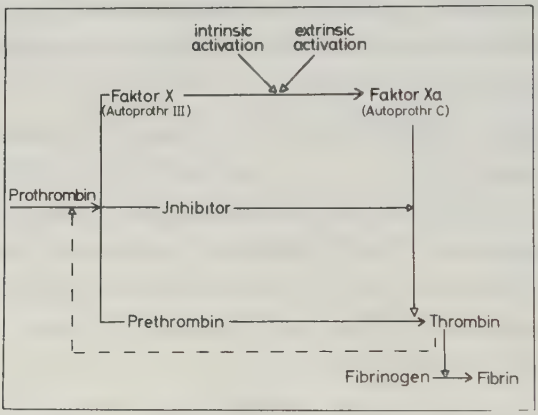

Abb. 22: Wahrscheinliches Schema der Blutgerinnung. Einzelheiten siehe Text! Zeichenerklärung: ⟶ Umwandlung in, ⟶ Einwirkung auf, - - - - ⟶ Rückkoppelung über. (vgl.: Schröer, XIII. Int. Congr. haemat., München 1970, Abstr. Vol. S. 15)

Reaktionsablauf zeigt. Man erkennt, daß der eigentliche, den Umfang der Gerinnung steuernde Mechanismus in der Stimulierung durch das "intrinsic"- bzw. "extrinsic system" zu suchen ist, was ja durchaus verständlich erscheint, wenn man annimmt, daß zur Erreichung des gewünschten Effektes im "extrinsic system" der lokale Umfang einer Noxe den Umfang der Reaktion bestimmt, und daß im "intrinsic system" zur Auslösung der in allen Gefäßen statthabenden latenten Gerinnung eine allgemeinere, in ihrem Ausmaß jedoch unbegrenztere Stimulierung zu fordern ist. Die Aufgabe des

Thrombin ist neben der Überführung von Fibrinogen in Fibrin in der Auslösung eines autokatalytischen Prozesses zu sehen, der für eine ausreichende Nachlieferung von Faktor X und insbesondere Prethrombin zu sorgen hat. Eine ins Uferlose sich ausweitende Gerinnung wird dann durch das übergeordnete Steuerungssystem ("intrinsic- und extrinsic system") auf dem Wege der Begrenzung der Aktivierung von Faktor X in Faktor Xa und möglicherweise durch den oben genannten Inhibitor verhindert.

Die abschließenden Tierversuche sollten nun die biologische Wirksamkeit des Prothrombins und seiner Derivate zeigen und klären helfen, welcher der Vorstellungen vom Gerinnungsablauf der Vorzug zu geben ist. Als Ausgangsmaterial diente Prothrombin, das nach dem beschriebenen modifizierten Reinigungsverfahren gewonnen worden war. Grundgedanke der Versuche war, daß gemeinsame Gabe der Derivate des Prothrombin dieselbe Wirkung wie das ursprüngliche Prothrombin haben müsse.

WITTE beschrieb, daß tiefgreifende Störungen der Gerinnbarkeit des Blutes eine allgemeine Steigerung der Gefäßpermeabilität zur Folge haben (64). Gaben hoher Dosen von Dicumarol mußten demnach geeignet sein, durch Senkung des Prothrombinspiegels eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität mit der typischen Erscheinung einer erhöhten transmuralen Farbstoffpassage hervorzurufen. Diese Vermutung erwies sich als richtig (siehe Abbildung 21, S. 48), und wurde ergänzt durch die Beobachtung, daß im Zustand der Hypoprothrombinämie vor allem auch perivasale Extravasate (singuläre Erythrozytendiapedesen und Kugelblutungen) als einwandfreie Zeichen einer verminderten Kapillarresistenz auftraten. Die eventuelle Aufhebung dieser Effekte durch Gaben von Prothrombin oder dessen Zymogenen Prethrombin und Autoprothrombin III mußte daher indirekt Aussagen über die Reaktionsweisen dieser Proteine zulassen.

Entsprechend dem obigen, erweiterten Grundschema der Blutgerinnung nach SEEGERS war zu erwarten, daß durch Prothrombinmangel hervorgerufene Gefäßwandveränderungen durch Gabe von Prothrombin oder kombinierte

Gabe von Prethrombin und Autoprothrombin III, nicht aber durch Gabe von Prethrombin - dem Thrombinpotential also - allein zu beheben wären.

Die Untersuchungen an der mesenterialen Endstrombahn von Kaninchen bestätigten nun, daß die aus dem Prothrombin durch In vitro - Auftrennung gewonnenen Zymogene Prethrombin und Autoprothrombin III in der Lage waren, das Prothrombindefizit bei anteilsmäßiger kombinierter Gabe zu decken, also über eine Wiederermöglichung der latenten intravaskulären Gerinnung wieder normale Gefäßwandverhältnisse herzustellen, wogegen die alleinige Gabe von Prethrombin dies nicht vermochte.

Geht man davon aus, daß durch Dicumarolapplikation die Blutfaktoren II, V, VII, IX und X (19) nicht mehr in der Leber gebildet werden, wodurch sich deren Gehalt im Blut auf wenige Prozent der Norm verringert, so kann man die Tatsache, daß durch Prethrombin + Autoprothrombin III -Gabe wieder normale Gefäßwandverhältnisse hergestellt werden können, nicht mit der Kaskadentheorie erklären. Ihr zufolge dürfte nämlich dieser Effekt nur eintreten, wenn man gleichzeitig auch noch den Faktor V substituiert, da der aktivierte Faktor X (= Autoprothrombin C) erst über die Aktivierung des Faktor V eine Aktivierung des Thrombinzymogens einleitet. Aus diesem Grund können auch die Ergebnisse der Tierversuche als eine Bestätigung der autokatalytischen Derivatetheorie der Blutgerinnung nach SEEGERS betrachtet werden, während sich aus ihnen weitere Zweifel an der Richtigkeit der Kaskadentheorie ergeben.

V. Zusammenfassung

Einleitend wird auf die sich aus den verschiedenen Auffassungen über den Mechanismus der Prothrombinaktivierung ergebenden Forderungen nach Herstellung höchstgereinigter Prothrombinpräparate hingewiesen. Die Qualität der Präparate sei zu steigern, sie seien hinsichtlich Reinheit und Einheitlichkeit zu überprüfen, die Struktur des Prothrombin sei zu beurteilen, und die Fähigkeit seiner Derivate zur Substitution von Marcumar -bedingten Prothrombinmangelzuständen zu überprüfen.

Im Anschluß an die Angaben zur Methodik werden im Ergebnisteil die Befunde mitgeteilt und ihre Bedeutung in der Diskussion am Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen gewertet. Die wesentlichen Befunde seien noch einmal aufgeführt.

Bei den beiden miteinander verglichenen Prothrombinisolierungsverfahren, dem modifizierten Originalverfahren nach SEEGERS (43) und einem Verfahren, bei dem die Ammoniumsulfatfällungen durch Dialyse nach vorheriger zusätzlicher pH-Einstellung ersetzt wurden, erwies sich das modifizierte Originalverfahren als überlegen.

Die im modifizierten Verfahren gegenüber dem Originalverfahren erreichten gesteigerten spezifischen Aktivitäten von durchschnittlich 31 500 - 35 000 E/mg Tyrosin sind im wesentlichen bedingt durch eine längere Sedimentationszeit bei gleichzeitiger Verkürzung der Gesamtversuchsdauer, eine Verbesserung der Desorptionstechnik durch Entschäumung des Desorbates mit anschließendem Abzentrifugieren der $MgCO_3$-Kristalle sowie insbesondere durch fraktionierte Ausfällung des Endpräparates.

Ohne Anwendung von Chromatographieverfahren gelang durch die fraktionierte Ausfällung die Herstellung von Präparaten mit einer bisher noch nicht erreichten höchsten spezifischen Aktivität um 45 000 E/mg Tyrosin.

In Untersuchungen der Spitzenpräparate hinsichtlich Reinheit und Einheitlichkeit erwiesen sich diese bei der Celluloseacetatelektrophorese,

Diskelektrophorese und im Elektrofokussierungsverfahren als homogen. Die bei pH 8,6 bei der Celluloseacetatelektrophorese weniger gereinigter Präparate geschilderte Dissoziation in zwei Banden trat nicht mehr auf, sie stellt ein Zeichen von Verunreinigung dar.

Der isoelektrische Punkt des Prothrombin mit pH 4,25 bei Ionenstärke 0,2 konnte mit dem Elektrofokussierungsverfahren bestätigt werden. Er stimmt nicht mit dem Maximum der Ausfällbarkeit überein, das je nach spezifischem Widerstand der Proteinlösung zwischen pH 4,75 und pH 4,95 liegt.

Die vielseitigen Aktivierungsmöglichkeiten des Prothrombin und seine hohe Abspaltungsbereitschaft an DEAE-Cellulose und im Elektrofokussierungsverfahren läßt die Annahme zu, daß es sich beim Prothrombin nicht um ein Molekül im klassischen Sinn, sondern um einen Komplex im Sinne einer Quartärstruktur handelt.

Komplexnatur und wahrscheinlicher chemischer Aufbau des Prothrombin gaben den Anlaß zu dem Versuch der Aufstellung eines erweiterten Grundschemas der Prothrombinaktivierung.

Gaben des nach dem modifizierten Verfahren hergestellten Prothrombins sowie seiner Derivate Prethrombin und Autoprothrombin III vermochten durch vorherige Dicumarolapplikation hervorgerufene erhöhte Kapillarpermeabilität der jejunalen Endstrombahn von Kaninchen zu beheben. Dieser Befund läßt weitere Zweifel an der Richtigkeit der Kaskadentheorie aufkommen und stützt die SEEGER'schen Vorstellungen vom Konzentrat der Sequenz der Prothrombinaktivierung.

Gern nehme ich die Gelegenheit wahr, mich bei Herrn Professor Dr. med. H. Schröer herzlich für die Überlassung des Themas und die Anleitung bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit zu bedanken.

Herrn Professor Dr. med. E. Bauereisen, dem Vorstand des Physiologischen Institutes der Universität Würzburg, bin ich für die Übernahme des Korreferates und die mir gewährte Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Hauck danke ich für die praktische Durchführung der Tierversuche.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei an dieser Stelle der Dank für die großzügige finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit ausgesprochen.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALEXANDER, B.: Some biochemical, physiochemical and immunochemical studies of prothrombin and proconvertin (factor VII): Their biopathologic significance, in: E. Deutsch, Blodclotting factors, ed. Proc. 4th, Int. Cong. Biochem., Pergamon Press, London 1958, S. 37

2. ANDRASSY, K., KRAUSE, W., EGBRING, R., EGLI, H.: Erfahrungen und Modifikationen zur Herstellung von Prothrombin nach Seegers, Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 21:561 (1969)

3. AOKI, N., HARMISON, Ch. R., SEEGERS, W. H.: Properties of bovine Acglobulin concentrates and methodes of preparation: Can. J. Biochem. Physiol. 41, 2409 (1963)

4. BARNHART, M. I.: Immunologic qualities of purified prothrombin, in: W. H. Seegers, Blood-clotting enzymology, Academic Press (New York, London) 1967, 226

5. BERNAL, I. D.: Structure arrangements of macromolecules, in: Discussions of the Faraday Society, 25, 7 (1958), The Aberdeen University Press Ltd., Aberdeen, Scotland

6. CARLSTRÖM, A., VESTERBERG, O.: Isoelektric focusing and separation of the subcomponents of lactoperoxidase, Acta Chem. Scand. 21, 271 (1967)

7. COLE, E. R., MARCINIAK, E., SEEGERS, W. H.: Procedures for the quantitative determination of Autoprothrombin C: Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 8, 434 (1962)

8. COPLEY, A. L.: Capillary permeability versus fragility and the significance of fibrin also a physiologic cement of the blood vessel wall, 2th Europ. Conf. Mikrocirculation Pavia 1962, in: Bibl. anat. (Basel) 4, 3 (1964)

9. DAVIE, E. W., RATNOFF, O. D.: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting, Science 145, 1310 (1964)

10. DUCKERT, F., KOLLER, F., MATTER, M.: Purification and physiological properties of factor VII from plasma and serum: seperation from prothrombin, Proc. Soc. exp. Biol. (New York) 82, 259 (1953)

11. FLATMARK, T., VESTERBERG, O.: On the hetrogeneity of beef heart cytochrome C, isoelektric fractionation by electrolysis in a natural ph-gradient, Acta Chem. Scand. 20, 1497 (1966)

12. FOLIN, O., CIOCALTEU, V.: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)

13. GOLDSTEIN, R., LE BOLLOCK, A., ALEXANDER, B., ZONDERMANN, E.: Preparation and properties of prothrombin, J. Biol. Chem. 234, 2857 (1959)

14. HARMISON, Ch. R., MAMMEN, E. F.: Relation of Autoprothrombin III to other protein preparations, in: Seegers, W. H.: Blood clotting enzymology, Academic Press (New York, London), 62 (1967)

15. HAUCK, G., SCHRÖER, H.: Fluoreszenzmikroskopische Lebendbeobachtung zur Frage der Abhängigkeit der Gefäßwand-Schrankenfunktion vom hämostatischen Gleichgewicht. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 13, 439 (1965)

16. KAZAL, L. A., AMSEL, S., MILLER, O. P., TOCANTINS, L. M.: The preparation and some properties of fibrinogen precipitatet from human plasma, Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med., 113, 989 (1963)

17. KLAGES, F.: Einführung in die Organische Chemie, S. 11 (= 17a) und 332 (= 17b), Walter De Gruyter u. Co., Berlin (1961)

18. KOHN, I.: Zelluloseacetat-Elektrophorese, Das Ärztliche Laboratorium, 8, 233 (1964)

19. KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.: Pharmakologie, S. 70. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1967)

20. LAKI, K., KOMINZ, D. R., SYMONDS, P., LORAND, L., SEEGERS, W. H.: The aminoacid composition of bovine prothrombin, Arch. Biochem. 49, 276 (1954)

21. LAMY, F., WAUGH, D. F.: Certain physical properties of bovine prothrombin, J. Biol. Chem. 203, 489 (1953)

22. LAMY, F., WAUGH, D. F.: Transformation of prothrombin into thrombin, Physiol. Rev., 34, 722 (1954)

23. LECHNER, K.: Aktivierung des Prothrombin, S. 37, in: Schröer, H., Prothrombin, Kontaktaktivierung, Niereninsuffizienz und Hämostase, F. K. Schattauer Verlag, Stuttg. (1968)

24. LECHNER, K., DEUTSCH, E.: Activation of factor X, Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 13, 314 (1965)

25. MAC FARLANE, R. G.: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier, Nature (London) 202, 498 (1964)

26. MAGNUSSON, S.: Fractionation of prothrombin preparation, in: I. S. Wright, F. Koller and E. Beck, Progress of coagulation, S. 229, Wiesbaden 1961

27. MAGNUSSON, S.: Fraktionation of bovine prothrombin preparations by gradient chromatography on TEAE-cellulose columns, Arkiv Kemi, 24, 217 (1965)

28. MAGNUSSON, S.: NH_2-terminal amino acid residues in bovine prothrombin and in prothrombin activation mixtures. With a note on the amino acid composition of chromatographically purified bovine prothrombin, Arkiv Kemi 23, 271 (1965)

29. MAGNUSSON, S.: Preparation and carbohydrate analysis of bovine prothrombin, Arkiv Kemi 23, 285 (1965)

30. MAMMEN, E.F.: in Diskussion zu: Aktivierung des Prothrombin, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.), Suppl. 25, 51 (1968)

31. MAMMEN, E.F., RAMIEN, A.: Die Anwendung von Gelfiltration zur weiteren Reinigung von Rinderprothrombin, Thrombos.Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 8, 37 (1962)

32. MARCINIAK, E., COLE, E.R. SEEGERS, W.H.: Autoprothrombin C activity from prothrombin with snake venom or trypsin, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 8, 425 (1962)

33. MARCINIAK, E., SEEGERS, W.H.: Autoprothrombin C: A second enzyme from prothrombin, Canad.J.Biochem.Physiol. 40, 597 (1962)

34. MARCINIAK, E., SEEGERS, W.H.: Experiments with prothrombin, prethrombin, autoprothrombin III and plasma with prothrombin related deficiencies, New Istanbul Contribution Clin.Sci. 8, 117 (1965)

35. MILLER, K.D.: Chromatographic isolation of plasma prothrombin and trans-alpha-glucosylase, J.Biol.Chem. 231, 987 (1958)

36. MOORE, H.C., LUX, S.E., MALHORTA, C.P., BAKERMAN, S., GARTER, I.R.: Isolation and purification of bovine and canine prothrombin, Biochim.Biophys.Acta 111, 174 (1965)

37. RENO, R.S., SEEGERS, W.H.: Two-stage procedur for the quantitative determination of autoprothrombin III concentration and some applications, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 18, 198 (1967)

38. RIDDLE, I.M., BERNSTEIN, M.H., SEEGERS, W.H.: Ultrastructure of prothrombin and thrombin molecules, Thrombos.Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 9, 12 (1963)

39. SCHRÖER, H.: Zur Frage des Mechanismus der Prothrombinaktivierung, Grundlagenforschung Bd.III, S.599. Georg Thieme Verlag Stuttg. (1960)

40. SCHRÖER, H., HAUCK, G.: Influence of the blood clotting potential on the barrier function of the vessel wall, 5th Europ.Conf.Microcirculation, Gothenburg 1968. Bibl.anat., No.10, 418-423 (Karger, Basel/New York 1969)

41. SCHRÖER, H., HEENE, D., SEEGERS, W.H.: Addition of prothrombin to blood from dogs receiving Dicumarol, Thrombos.Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 13, 187 (1965)

42. SEEGERS, W.H.: Purification of prothrombin and thrombin: chemical properties of purified preparations, J.Biol.Chem. 136, 103 (1940)

43. SEEGERS, W.H.: The purification of prothrombin, Rec.Chem.Progr. (Kresge-Hooker Sci.Lib.) 13, 143 (1952)

44. SEEGERS, W.H.: Enzyme theory of blood clotting, Federat.Proc. 23, 749 (1964)

45. SEEGERS, W.H.: Preparation, purification and assay of thrombin, in: Tocantins, L.M., Kazal, L.A.: Blood coagulation, haemorrhage and thrombosis, Grune u. Stratton (New York, London), S.174 (1964)

46. SEEGERS, W.H.: Basis enzymology of blood coagulation, Thrombos. Diathes.haemorrh. (Stuttg.) 14, 213 (1965)

47. SEEGERS, W.H., AOKI, N., MARCINIAK, E.: Autoprothrombin C and the generation of thrombin from prothrombin activation mixtures, New Istambul Contribution Clin.Sci. 5, 170 (1962)

48. SEEGERS, W.H., COLE, E.R., HARMISON, Ch.R., MARCINIAK, E.: Purification and some properties of autoprothrombin C, Can.J.Biochem.Physiol. 41, 1047 (1963)

49. SEEGERS, W.H., HARMISON, Ch.R., IVANOVIC, N., HEENE, D.: Free boundary elektrophoresis of purified prothrombin and thrombin, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.), 15, 343 (1966)

50. SEEGERS, W.H., LANDABURU, R.H.: Purification of prothrombin and thrombin by chromatography on cellulose, Can.J.Biochem. 38, 1405 (1960)

51. SEEGERS, W.H., LOOMIS, J.M., VANDERBELT, J.M.: Preparation of prothrombin products: isolation of prothrombin and its properties, Arch.Biochem. 6, 85 (1945)

52. SEEGERS, W.H., MARCINIAK, E.: Some activation characteristics of the prethrombin subunit of prothrombin, Life Sciences 4, 1721 (1965)

53. SEEGERS, W.H., MARCINIAK, E., HEENE, D.: Enzyme basis of prothrombin activation (blood clotting) with an analysis of hemophilia B, Texas Rep.Biol.Med. 23, 4:675 (1965)

54. SEEGERS, W.H., McCLAUGHRY, R.I., FAHEY, I.L.: Some properties of purified prothrombin and its activation with sodium citrate, Blood 5, 421 (1950)

55. SEEGERS, W.H., SCHRÖER, H., MARCINIAK, E.: Prothrombin activation, in: Blood Clotting Enzymology, Academic Press, New York and London, S.103

56. SOULIER, I.P.: Un nouvel adsorbant des facteurs de coagulation: la Betonite, Rev. hémat. 14, 26 (1959)

57. STREULI, F.: On the purification and conversion of human prothrombin, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.), 3, 194 (1959)

58. SURGENOR, D.M., ALEXANDER, B., GOLDSTEIN, R., SCHMID, K.: A system for the seperation of the protein components of human plasma: II - the components of the clotting process, J.Phys.Colloid.Chem. 55, 94 (1951)

59. THOMAS, W.R., SEEGERS, W.H.: Terminal amino acids of bovine prothrombin and thrombin preperations, Biochim.Biophys. Acta (Amst.) 42, 556 (1960)

60. VESTERBERG, O.: Seperation of myoglobins and studies on their elektrochemical differences, Acta Chem.Scand. 21, 206 (1967)

61. VESTERBERG, O., SVENSSON, H.: Isoelektric fractionation, analysis, and the characterisation of ampholytes in natural pH gradients, Acta Chem.Scand. 20, 820 (1966)

62. WAGNER, O.R.: in Diskussion zu: Aktivierung des Prothrombin, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.), Suppl. 25, 48 (1968)

63. WARE, A.G., SEEGERS, W.H.: Two-stage procedur for the quantitative determination of prothrombin concentration, Amer.J.Clin. Path. 19, 471 (1949)

64. WITTE, S.: Steigerung der Capillarpermeabilität durch Blutgerinnungsstörungen, Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.), 2, 146 (1958)

Lebenslauf

Am 11. November 1941 wurde ich als Sohn des Facharztes für Innere Krankheiten Dr. med. Karl-Heinz Platzek und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Jaeger, in Breslau geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Im Jahr 1943 verließen wir Breslau und zogen nach Asch/Sudtg. Von dort kamen wir nach Neuhausen/Rehau und später nach Kirchehrenbach bei Forchheim/Ofr. Meinen jetzigen Wohnsitz fand ich 1947 in Forchheim. Dort besuchte ich auch von 1. 9. 1947 an die evang. Volksschule und ab 1952 das dortige humanistische Gymnasium, das ich im Sommer 1962 nach erfolgreicher Ablegung der Reifeprüfung verließ.

Vom 1. Oktober 1962 bis 31. März 1964 leistete ich meinen Grundwehrdienst ab und begann mit dem 1. April 1964 mein Medizinstudium an der Universität Würzburg, wo ich im Frühjahr 1965 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Herbst 1966 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Wintersemester 1966/67 studierte ich dann an der Universität Innsbruck und kehrte zum Sommersemester 1967 wieder zur Universität Würzburg zurück, wo ich im Dezember 1969 mein Staatsexamen mit gutem Erfolg beendete. Seit dem 1. 1. 1970 bin ich als Medizinalassistent am Städtischen Krankenhaus Forchheim angestellt.

Am Physiologischen Institut der Universität Würzburg wurde mir Gelegenheit zur Abfassung der vorliegenden Dissertation gegeben.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Rolf-Christian Platzek

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg, Ludwigkai 28a, Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80